

# 2017 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號 060002

參展科別 植物學

作品名稱 粟之高禾—探討小米不為人知的耐鹽機密

得獎獎項 大會獎：一等獎

就讀學校 臺南市私立德光高級中學

國立臺南女子高級中學

指導教師 江芝韻、鄭楷騰

作者姓名 巴洛克、王定澤、楊茜雯

關鍵字 小米、逆境、耐鹽

## 作者簡介



我是楊茜雯，目前就讀國立台南女子高級中學二年級。從國中開始就跟著老師做科展，到現在已經第五年了，我喜歡做實驗的感覺，在做實驗的過程中，雖然不輕鬆、常遇到失敗，但這些都是讓我能夠成長的經歷。

從之前當作興趣做實驗到現在能有機會參加國際科展，我希望可以把握這次的機會，並向跟更多人學習。

我的名字是巴洛克，目前就讀於私立德光中學普通科二年級。從國一到現在，已經做了五年的科展了。我喜歡實事求是，而這與做科學研究的精神相符合。每當發現了自己過去不知道的事情，總是令自己欣喜。在研究的路上遇到各種阻礙和困難，成為了我成長的養分。

這次有榮幸可以參與國際科展的比賽，除了感謝提供我們材料的親友，更是感謝教導我們多年的老師。因為有他們的諄諄教誨，才能使我們成長至今。

我是王定澤，做科展已經有五年了，從一開始對科學沒概念的國一生，到現在已經是進入國際殿堂的參賽者了，在這五年中，我學習到許多有關科學的知識，特別是生物，因此燃起了我對農業改良的興趣，在科展這條路上，走得不算輕鬆，但也因為這樣，我才能成長，科學對於我，就有如魚對於水一樣，彼此已經產生不可分離的關係了。

## 摘要

隨著全球氣候變遷，能在極端環境下生存的作物，是未來農業的救命藥。原住民種植的小米，具有在嚴苛環境下生長的特性。比較小米和水稻在鹽逆境的生長狀況，發現小米的根長、葉長及側根生長狀況都比水稻來的好，且小米具有花青素累積的現象。氣孔方面，小米在 0.15% 鹽濃度就能關閉氣孔，水稻則需到 0.3% 鹽濃度才會關閉。透過生化分析，發現小米在鹽逆境下抗氧化酵素與澱粉酶的活性皆比水稻高，此外小米亦能在鹽逆境下累積較多的脯胺酸與維他命 C，藉此提升小米的耐鹽能力。我們另比較小米與水稻對於淹水逆境的耐受性，結果顯示水稻在淹水逆境下地上部與地下部的生長狀況皆比小米佳，而淹水三天的小米仍無法在植株內累積脯胺酸來對抗淹水逆境，但外加脯胺酸卻能有效提升小米耐淹能力，另外水稻能透過形成通氣組織來增加淹水逆下根部的氣體交換，並能透過外加鈣離子來增加通氣組織的面積，但在小米則無此機制。透過實驗能讓我們了解作物抵抗逆境機制的優劣，期待未來能將結果運用於氣候變遷下的作物育種，造福全人類。

## ABSTRACT

The impacts of climate change on plants, sessile organisms, have increased significantly. The stress-tolerant plants will be the future of agriculture and human beings. In Taiwan, the aborigines have grown foxtail millets (*Setaria italica*) for a long time, especially in the harsh environment. In this study, we discovered that foxtail millets are more tolerant than rice in salinity-stress by comparing the root length, leaf length, and the number of lateral roots. Also, the foxtail millets accumulate anthocyanin. The treatment to low salt concentration (0.15% NaCl) provokes the stomata closure of foxtail millet whereas higher salt concentration (0.3% NaCl) was required for stomata closure in rice. Through biochemical analysis, we found that the activities of amylase and antioxidant enzymes of millets are much higher than the ones of rice under salt stress. Besides, millets also accumulated more proline and vitamin C, which assist its ability in salt tolerance. However, in flooding stress, rice has better tolerance in growth condition while foxtail millets show

insignificant proline accumulation against flooding. Adding proline assist millets with better tolerance to face flooding. Additionally, there is aerenchyma in rice roots, which reinforced the gas exchange under flooding. Through calcium adding, rice has more aerenchyma formed while millet has no visible variation. In this research, we investigate that plants have different strategies to face stresses. These results can be used for crop breeding in the future to tackle climate change, leading to the better life of human beings.

## 壹、 研究動機



小米是被原住民種植在山區的主食，而在過去小米也是中國北部地區的主食，直到水稻傳入後，中國地區的主食才變為水稻。水稻雖然比起小米更受到歡迎，但是同為主食，我們想知道兩者之間的生長狀況與能力是否也會有所差異呢？雖然水稻比起小米更受大眾喜愛，可是在耐鹽性與生存能力上，有贏過小米嗎？若是小米勝過水稻，也許就可以作為現今氣候變遷時代下的重要糧食作物。因此我們將小米與水稻種植在高鹽的高滲透壓環境中，期待可以找出兩者耐鹽性的差異與生存能力的強弱，並了解到究竟是小米還是水稻更適合在這氣候變遷的環境中生存。

## 貳、 研究目的


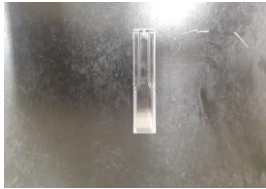














- 一、 觀察小米與水稻的成長歷程
- 二、 觀察小米與水稻的成長狀況
- 三、 比較小米和水稻在鹽逆境下的外觀差異
- 四、 比較小米和水稻在鹽逆境下的生理機制差異
- 五、 探討小米在鹽逆境下，為何能生長比水稻好
- 六、 比較小米和水稻在淹水逆境下的外觀差異
- 七、 比較小米和水稻在淹水逆境下的脯胺酸含量差異
- 八、 分析比較數據並繪圖紀錄






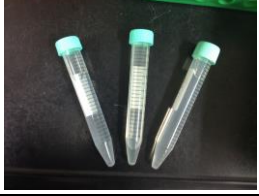


## 參、 研究設備及器材

### 一、 研究材料：小米(*Setaria italica*)、水稻(*Oryza sativa*) (表一)

|   |  |
|---|--|
|  |  |
| <p>小米(<i>Setaria italica</i>)</p>   | <p>水稻(<i>Oryza sativa</i>)</p>   |

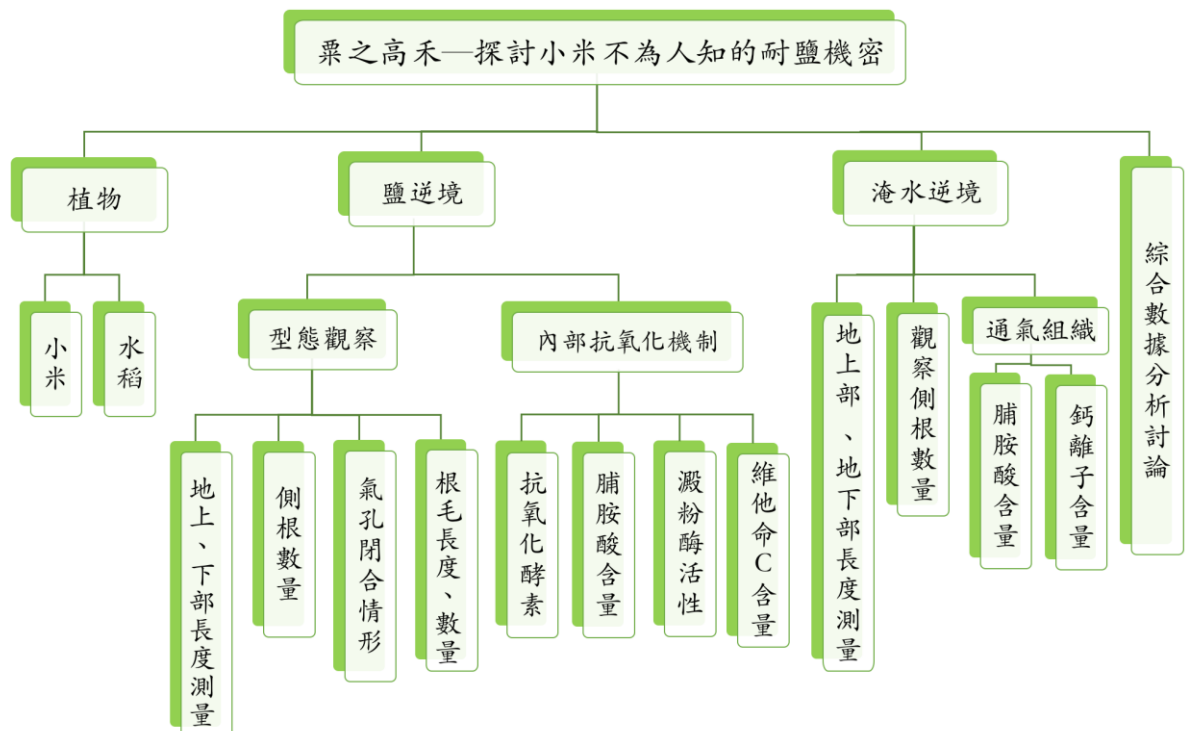
### 二、 實驗器材：

|   |   |  |   |
|---|---|--|---|
|   |   |   |   |
| <p>磁石</p>   | <p>比色管</p>  | <p>分光光度計</p>   | <p>50ml離心管</p>  |
|  |  |  |  |
| <p>加熱攪拌器</p>  | <p>植物生長燈</p>  | <p>燒杯</p>  | <p>擦手紙巾</p>   |
|  |  |  |  |
| <p>鋁箔紙</p>  | <p>秤量紙</p>  | <p>數位相機</p>  | <p>培養皿</p>  |
|  |  |  |  |
| <p>橡膠手套</p>   | <p>解剖顯微鏡</p>  | <p>酸鹼測定儀</p>   | <p>震盪儀</p>  |

|   |   |  |   |
|---|---|--|---|
|  |  |  |  |
| 錐形管   | 微量吸管  | 量筒   | 鑷子  |
|  |  |  |  |
| 防爆管   | 15ml離心管   | 電子天平   | 標籤紙   |

三、 實驗藥品：蒸餾水(ddH<sub>2</sub>O)、DAB、氯化鈉、茚三酮、過氧化氫  
 磺基水楊酸、DNS 試劑、醋酸鈉、磷酸鉀緩衝溶液、磷酸鈉緩衝溶液

### 肆、 研究過程或方法



(圖一)研究架構流程圖

## 一、 蒐集種子：

### (一)小米種子來源：

與屏東縣霧台鄉霧台部落族人溝通後，當地族人願意提供小米作為實驗用途。且該小米為當地族人已種植許久之品種。

### (二)水稻種子來源：

與嘉義農人溝通協調後，願意將臺農 67 品種的種子給予我們作為實驗用途。

## 二、 觀察、比較不同時期的小米與水稻外表形態之異同。

### (一)了解小米與水稻生長狀況

### (二)比較小米與水稻在鹽逆境中的生長差異

### (三)比較小米與水稻在淹水逆境中的生長差異

## 三、 觀察小米與水稻在正常耕作條件下的生長情形—

### (一)確保小米與水稻生長在 25°C 環境中

### (二)種植在光源下三天後，將其鹽處理三天後進行實驗

## 四、 配製出鹽逆境的鹽水—

動機：為了模擬出鹽逆境，必須泡製適當濃度的鹽水，以討論小米與水稻的逆境表現狀況。

## 五、 水稻的催芽—

### (一)將水稻用 2.5% 的次氯酸鈉殺菌且置入 50ml 離心管以機器搖動 15 分鐘，

接著每 5 分鐘清洗一次，共清洗三次。

### (二)將清洗完畢的水稻種子放入已加水的培養皿中，加水 20ml。

### (三)再將水稻放在 37°C 恆溫箱三天。



## 六、小米的催芽—

(一)我們則將小米放入 64 顆種子進培養皿中且放入暗室中催芽 1 天。

(二)將小米移至生長箱三天。

## 七、抗氧化酵素活性測定

### (一)蛋白質萃取

1. 秤取 0.05g 的樣本。
2. 將樣本用液態氮磨成粉末。
3. 樣本刮起後放置 1.5ml 離心管中。
4. 加入 200 $\mu$ l 的蛋白質萃取液(50mM 磷酸鉀緩衝溶液, pH7.0 / 1mM EDTA)，樣本與萃取液混合均勻。
5. 在 4 $^{\circ}$ C 下，以 17800g，離心 10 分鐘。
6. 上清液吸出，並打入新的 1.5ml 離心管，在置於冰上。

### (二)樣本蛋白質濃度測量

1. 我們使用了 Bio Rad 公司出產的 *DC*<sup>TM</sup> Protein Assay，來測定樣本中蛋白質含量
2. 取蛋白質萃取液 2 $\mu$ l 與 Reagent A 100 $\mu$ l 混合。
3. 加入 Reagent B 800 $\mu$ l 均勻混合，並靜置 15 分鐘。
4. 將液體吸到比色管中，用分光光度測量 750nm 波長下的吸光值。
5. 讀值利用公式換算，得到樣本中蛋白質值的濃度。

### (三)過氧化酶(Guaiacol Peroxidase, G-POD)活性測量

1. 取離心管，並加入 0.5ml 100mM 磷酸鉀緩衝溶液(pH7.0)，在加入 0.25ml 的蒸餾水與 0.1ml 2.5%愈創木酚。
2. 加入 2 $\mu$ l 的蛋白質萃樣本，混和均勻。

3. 加入 0.1ml 10mM 過氧化氫。
4. 快速將液體倒入比色管中，測量 470nm 在第一分鐘吸光值變化。
5. 將讀值除以蛋白質濃度後，得活性。

#### (四)過氧化氫酶(Catalase, CAT)活性測量

1. 取離心管，並加入 990 $\mu$ l 50Mm 過氧化氫溶液。
2. 加入 10 $\mu$ l 的蛋白質樣本，混合均勻。
3. 液體倒入比色管測量 240nm 第一分鐘吸光值變化。
4. 將讀值除以蛋白質濃度後，得活性。

#### (五)維他命 C 氧化酶(APX)活性測量

1. 測量 0.02g 的冷凍樣本，並加入 1.8ml 的磷酸鈉緩衝溶液
2. 在 4°C的環境下，以 12000g 離心 20 分鐘
3. 先分別為每管加入 0.25ml 的磷酸鉀緩衝溶液
4. 再加入 0.25ml 的 1.5mM 維他命 C 溶液與 0.1ml 的 0.75mM EDTA
5. 最後取出上清液 0.025ml 混合均勻
6. 然後一加入 0.125ml 的 6mMH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>，混合均勻後便直接測量其吸光值 (290nm)，且過一分鐘後再次測量
7. 最後用差值除以其蛋白質濃度

#### (六)配置 150mM 的 pH7 磷酸鉀緩衝溶液 50ml

1. 加入 0.09225ml 的 1MK<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 與 0.05775ml 的 1MKH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 後，加水至 50ml

#### (七)配置 100mM 的 pH6.8 磷酸鈉緩衝溶液 50ml

1. 加入 0.0463ml 的 1MNa<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 與 0.0537ml 的 1MNaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 後，加水至 50ml

(八)配置 0.75mM 的 EDTA 50ml

1. 測量 2.1918g 的 EDTA
2. 加入約 5ml 的水後，加入微量 NaOH 使其完全溶解，最後加水至 15ml
3. 取 0.75ml 配好的 EDTA 溶液，加水至 50ml

(九)配置 6mM 的 0.5ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10ml

1. 加入 35% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.00583ml 後，加水至 10ml

(十)配置 1.5mM 的維他命 C 溶液 50ml

1. 測量 0.013g 的維他命 C 粉後，加水至 50ml

八、檢測植物體內脯胺酸—Proline 的含量

(一)檢測 Proline 含量

1. 將冷凍的樣本拿出，泡液態氮以免酵素活性過高
2. 將已秤重且加入鋼珠的樣本用震盪機震碎(15 秒一次，共四次)
3. 依樣本重量比加入 3% 磺基水楊酸(Sulfosalicylic acid)後，最重的加入 1.8ml，再震盪 3 分鐘
4. 在常溫下，用 5000g 的離心力轉 20 分鐘
5. 加入 0.4ml 茚三酮(Ninhydrin)、0.4ml 樣本液後，再加入 0.4ml 醋酸並且每個實驗組抽取 2 管樣本液
6. 放入 100°C 的水浴槽中 60 分鐘
7. 將樣本拿出後急速冷卻，將各濃度混為一管
8. 加入 1.6ml 甲苯
9. 震盪 15 秒後，靜置 10 分鐘，再使用分光光度計(520nm)測甲苯層

## (二)配置茚三酮(Ninhydrin)

1. 加入 6ml 醋酸
2. 加入 4ml 6M 磷酸.
3. 秤重 0.25g 水合茚滿三酮(Ninhydrin)後，充分攪拌均勻

## (三)配置 3% 磺基水楊酸(Sulfosalicylic acid)50ml(密度 1.84g/ml)

1. 取出 2.76g 的磺基水楊酸(Sulfosalicylic acid)
2. 加水加至 50ml

## 九、檢測植物體內澱粉酶活性

### (一)檢測植物體內澱粉酶

1. 將冷凍的樣本拿出，泡液態氮以免酵素活性過高
2. 將已秤重且加入鋼珠的樣本用震盪機震碎(15 秒一次，共四次)
3. 加入 0.2ml 的醋酸鈉緩衝溶液，並放於室溫 15 分鐘，期間每 2 分鐘震盪一次
4. 將萃取液在 4°C 溫度下，用 14000g 離心 15 分鐘後取其上清液 0.1ml
5. 再加入醋酸鈉緩衝溶液 0.1ml，並置入 38°C 恆溫槽 15 分鐘
6. 加入 0.2ml 的 40°C 澱粉液後，再置入 38°C 恆溫槽 2 小時，期間每 10 分鐘震盪一次
7. 加入 0.05ml 2M NaOH，並將其混和
8. 加入 0.45ml DNS 試劑，並置入 100°C 恆溫槽 5 分鐘
9. 將其放在冰上冷卻並停止反應
10. 用分光光度計(540nm)測量

(二)配置 2M NaOH10ml

1. 測量 0.8gNaOH
2. 加水至 10ml

(三)配置 1%DNS 試劑 50ml

1. 測量 0.8gNaOH、0.5g 的 DNS
2. 將其混合並加至 50ml 的水
3. 使其溶解至看不見顆粒後，加入 15g 的酒石酸並攪拌

十、淹水逆境模擬

- (一) 將催芽後的小米與稻米(5 顆)放入 120ml 燒杯中
- (二) 加入 100ml 水
- (三) 天后觀察紀錄

十一、比較小米與水稻的酵素基因序列

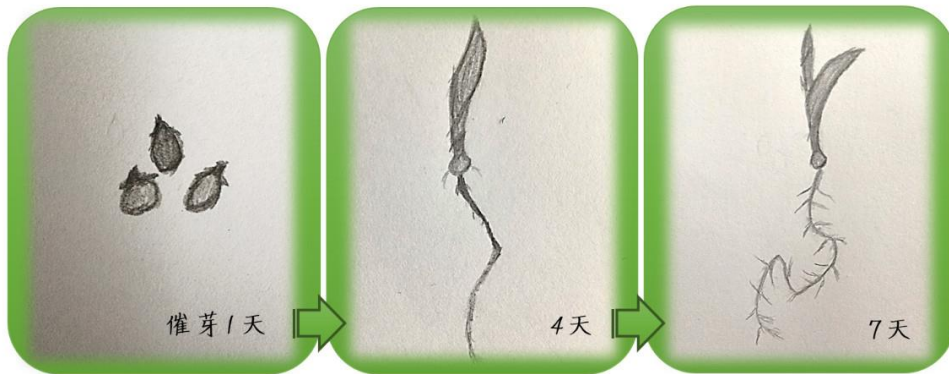
- (一) 進入 NCBI(National Center for Biotechnology Information)的網站
- (二) 以基因作為類別，搜尋小米與水稻的澱粉酶後，點選 FASTA 了解其序列
- (三) 將序列利用 Power Operation 進行分群
- (四) 將不同群的氨基酸序列利用 BLAST 等工具進行比對分析

十二、拍照記錄與測量根長與葉長

- (一) 配置 1.5%的洋菜膠並加入黑墨
- (二) 將植物放置墨盤上，放上比例尺，利用相機拍照
- (三) 使用 imageJ，透過計算比例尺來推算出根長與葉長，並統計會成圖表。

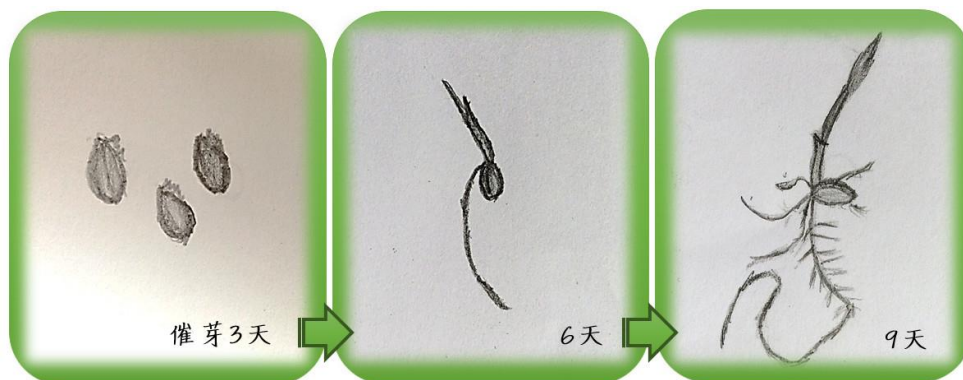
## 伍、研究結果

### 一、 觀察小米、水稻的成長歷程：



(圖二)小米成長手繪圖

在(圖二)中，我們可以看到小米的生長狀況。四天大時的小米，可以明顯地看到子葉與根的分佈，而且根的頂部有明顯的花青素累積；在越接近根帽的部分，花青素會累積越不明顯；再過三天後，小米的子葉有明顯的成長，根的長度也加長不少，還長出了側根，甚至莖的底部還有花青素的累積。當小米在七天大時，我們停止進行鹽逆境實驗，這時我們可以看到在控制組中的小米，葉長明顯加長，但根的狀況改變不大。

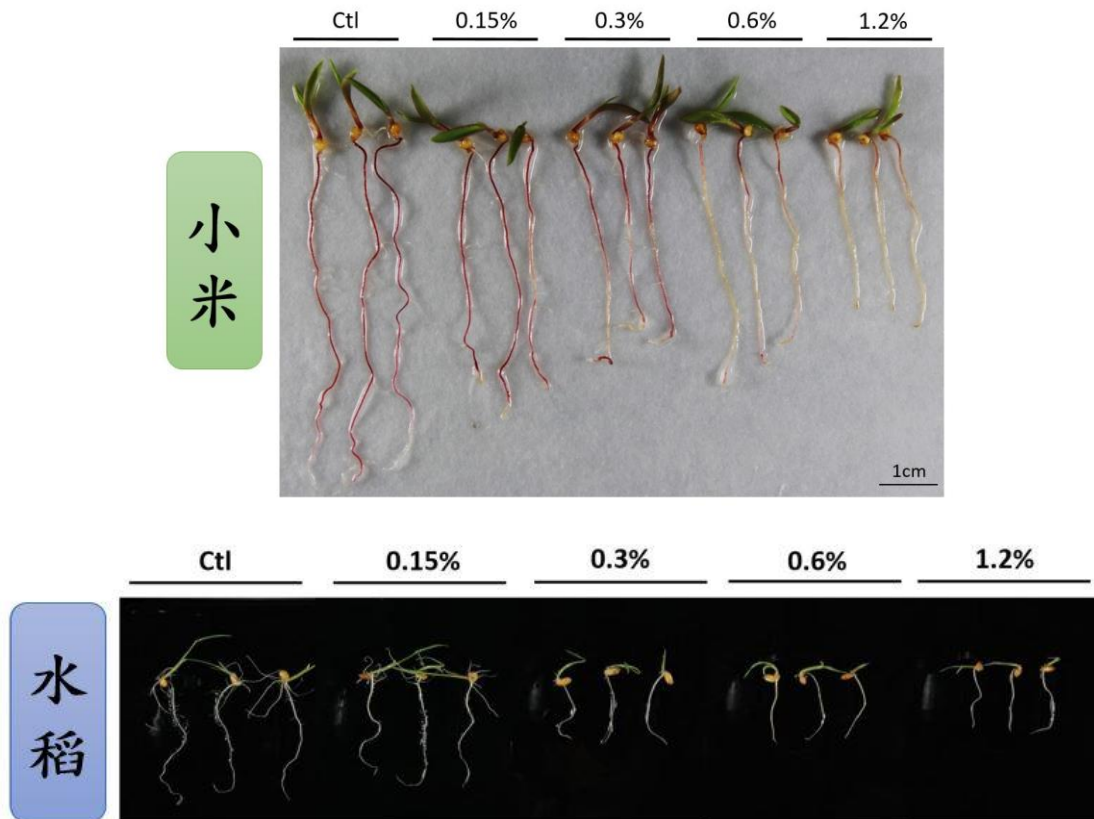


(圖三)水稻成長手繪圖

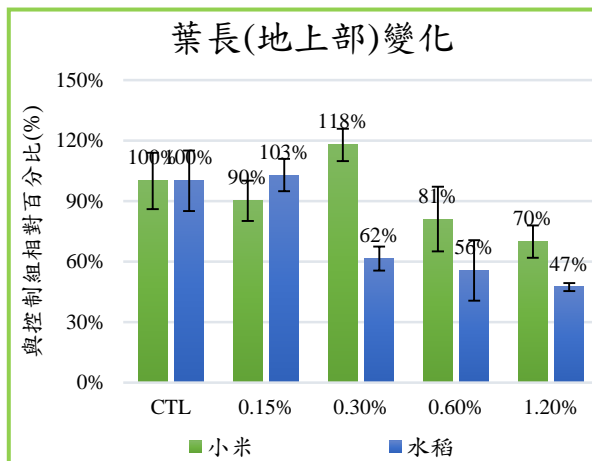
根據(圖三)，我們可以觀察到水稻的生長情形。首先我們能看到催芽三天的水稻在種子頂端一側冒出小芽；移至生長箱照光三天後則可以看到明顯的根，但與小米相比則沒有看出花青素的累積。再過三天後，水稻的子葉有明顯的成長，根的長度也加長不少，還長出其他側根與明顯的根毛。等到了水稻生長到九天大時，我們停止水稻鹽處理實驗，觀察控制組後，我們發現在控制組中的水稻，葉長與根長有明顯生長的現象。

二、 小米與水稻在鹽害逆境下的外形比較：

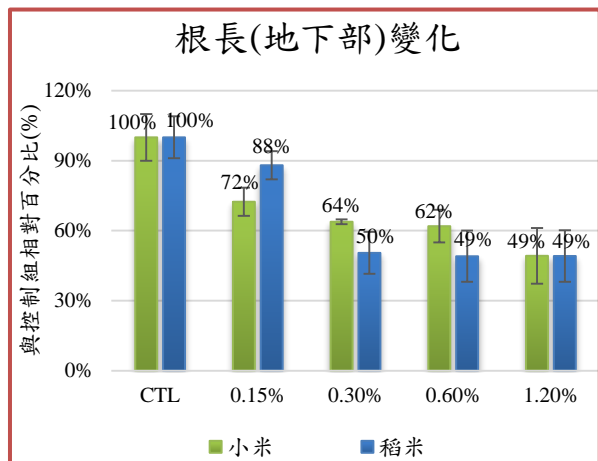
(一)小米與水稻的根長與葉長比較



(圖四)小米與水稻在鹽水下的生長狀況



(圖五)小米與水稻在鹽水下的葉長



(圖六)小米與水稻在鹽水下的根長

由(圖五)我們可以看到，小米在 0.3%的鹽逆境中，葉片長度與控制組相比的上升幅度是 18%。水稻在 0.3%的鹽逆境中，葉片長度與控制組相比的下降幅度為 38%。而在 0.6%的鹽逆境中，小米葉長的下降幅度為 19%，水稻葉長的下降幅度為 44%。

由此可明顯的發現，小米即使在高濃度的鹽逆境中，它的葉長不會跟水稻一樣有明顯縮短的變化。

而根長的變化中，同樣在 0.3%鹽逆境的情況下，小米與控制組相比，下降幅度為 36%。水稻與控制組相比，下降幅度是 50 %。

由此可見，在更高濃度的鹽逆境中，小米的根長才有明顯的變化，且下降幅度較水稻少。水稻在 0.3%的鹽逆境中根長有明顯縮短情況，但小米卻要等至 1.2%才有此狀況。

綜合以上數據，我們可以發現小米比起水稻擁有更佳的逆境耐受性。不論是葉長或是根長，我們都可以了解到小米比起水稻在逆境中的生存狀況更佳。

## (二)小米與水稻的花青素含量比較

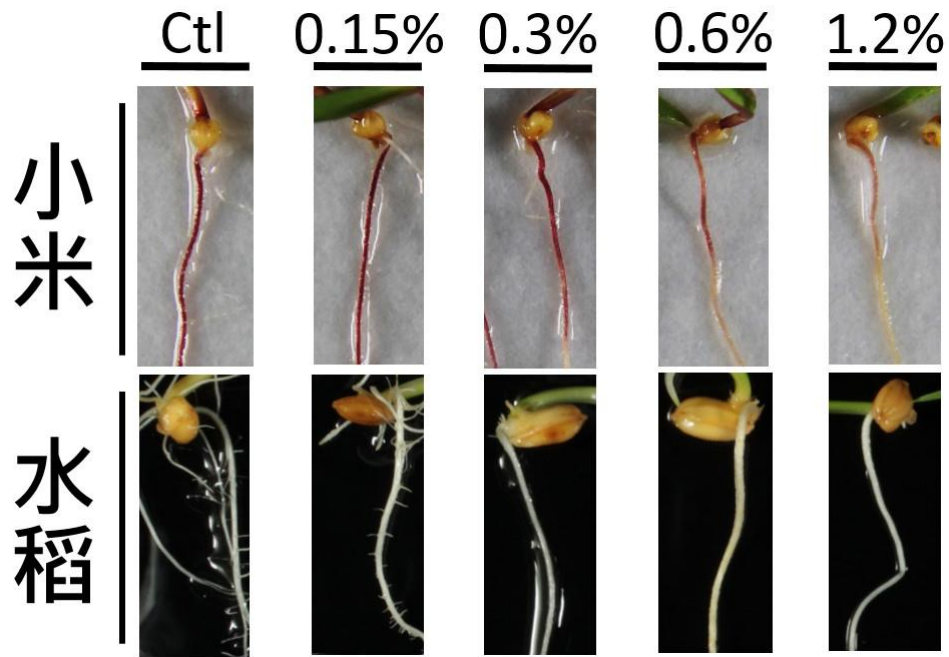
除了根長與葉長的成長差異，我們還可以發現到小米與水稻在不同程度的逆境中，根部上的花青素累積狀況也會有所不同。

我們知道，在逆境底下植物體內會產生過氧化物質，而過氧化物質會傷害植物體。我們所觀察到的花青素是多酚類的一種，結構中的 OH 基能夠作為抗氧化物質被消耗。那我們在外觀所觀察到的花青素累積差異與植物在不同逆境中的生存力是否會有關聯呢？

由下(圖七)中，我們可以發現到小米在越高濃度中的鹽逆境，根部所累積的花青素就越不明顯。尤其對照組與 1.2% 鹽逆境中，我們可以看到明顯的差異。小米對照組的花青素在根部累積情形非常明顯，但 1.2% 鹽逆境中累積狀況明顯減少許多。

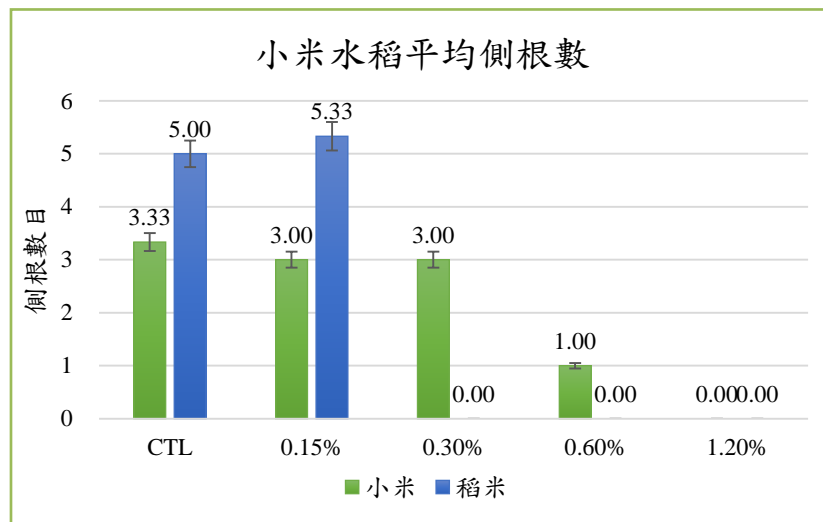
而水稻則不論在對照組或是鹽逆境中，都無法肉眼觀察到花青素累積的現象。在結合上述所觀察到的外觀差異，推測水稻可能會因為無累積可以清除過氧化物質的花青素，因此導致在鹽逆境下的生存狀況比小米差。





(圖七)小米與水稻處理鹽逆境三天後觀察根部花青素

(三)小米與水稻在鹽逆境下的側根數差異



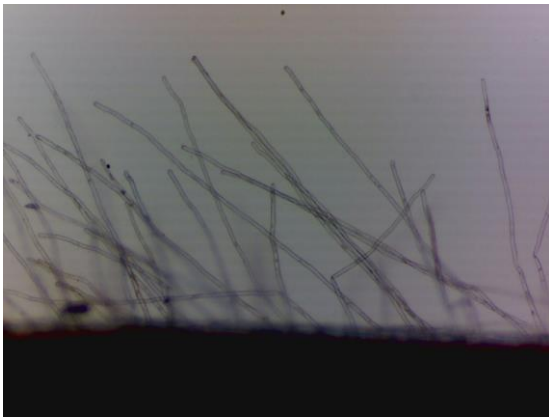
(圖八)小米水稻平均側根數

在生長型態觀察實驗中我們發現除了花青素的累積差異外，從(圖八)可知，小米跟水稻的側根生長情形也有所不同。側根能夠幫助植物吸收水與養分，因此藉由觀察側根的生長情形可以讓我們從外觀判斷植物在鹽逆境中的生長狀況。

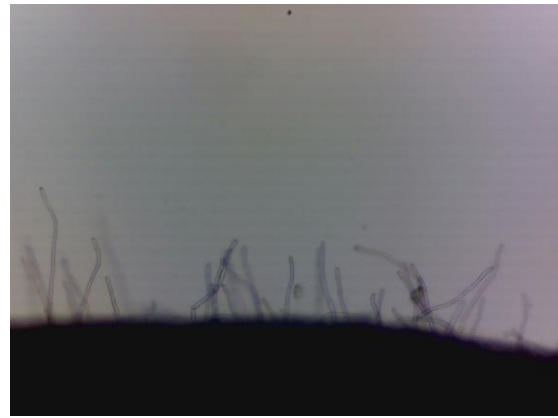
由實驗結果可知，我們在 0.3% 鹽逆境中就無法觀察到水稻的側根，而小米的側根在此濃度下生長情形較水稻佳，而小米的側根則是在 1.2% 鹽逆境中才呈現完全抑制生長的情形。因此可以推測小米比起水稻的鹽逆境耐受性較強，還能讓小米在較高濃度鹽逆境中增強吸水與養分的能力。

由這個實驗結果我們發現鹽逆境對於小米側根的生長抑制狀況較水稻不明顯，而讓小米在鹽逆境中可以維持吸收水分及養分的能力。因此可以得知小米較水稻有更佳的耐鹽能力。

#### (四)比較小米與水稻的根毛長度：



(圖九)小米根毛

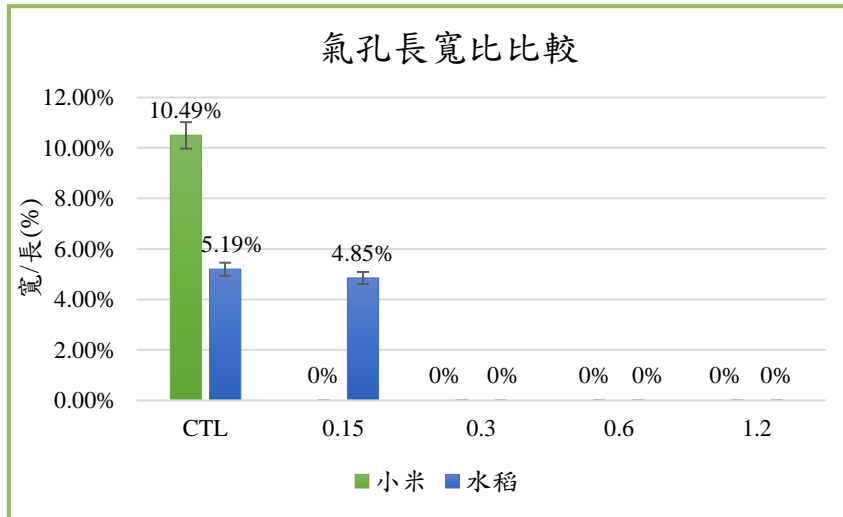


(圖十)水稻根毛

除了側根外，我們發現小米與水稻的根毛也有所差異。從這兩張圖中，我們可以明顯看到，在放大倍率相同的情況下，小米的根毛長度明顯的較水稻來得長、數量也較多。而鹽逆境是屬於難以吸收養分與水分的高滲透壓環境，較多與較長的根毛可以增加植物吸收水分的表面積，協助小米吸收更多的水分與養分，這也是使得小米較能生長在鹽逆境中的原因之一。

(五)比較小米與水稻在不同鹽逆境下的氣孔開闔：

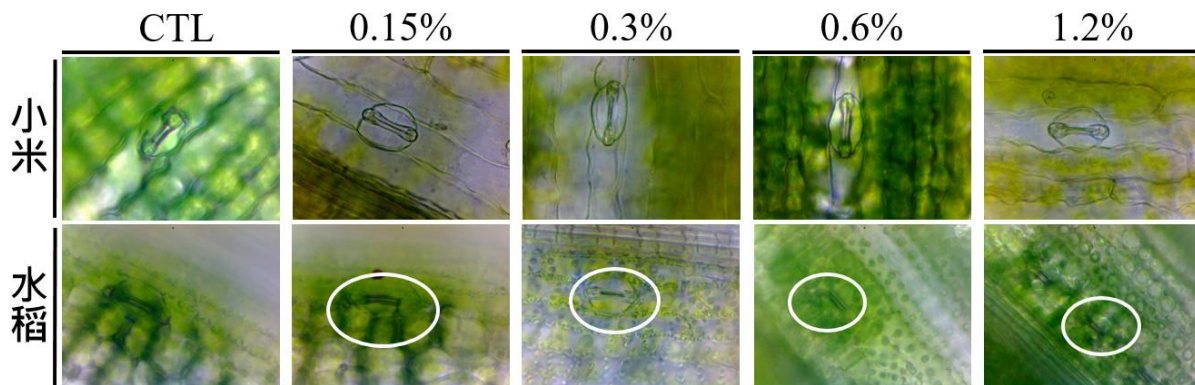
在小米與水稻的外型上觀察到明顯變化後，我們也想了解是否在肉眼不可觀測到的地方也會有所差異？



(圖十一)小米水稻氣孔長寬比比較

由這張圖我們可以看到，水稻與小米的氣孔形狀差異不大，但是我們發現 0.15% 鹽逆境下水稻的氣孔並無呈現關閉的情形，等到鹽濃度調高至 0.3% 時，水稻的氣孔才閉合；而小米在 0.15% 的鹽逆境中就將氣孔閉合，降低本身的水分蒸散，幫助小米在鹽逆境中維持生長。

由此現象可知，水稻比小米需要在更高濃度的鹽逆境中氣孔才會關閉。因此可以推測出水稻對於鹽逆境的敏感度較小米差，使它無法像小米一樣在鹽逆境中具有優勢。

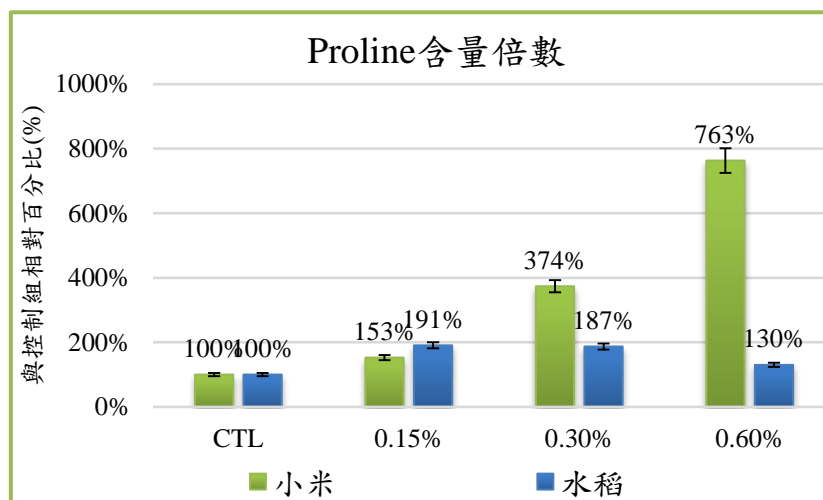


(圖十二)小米水稻氣孔開合比較

### 三、 比較小米與水稻在過氧化物質上的清除策略

#### (一)比較小米與水稻在不同鹽逆境下脯胺酸(Proline)含量：

我們猜想，小米與水稻在鹽逆境下生長狀況會變得不好，是因為環境滲透壓過大而使植物難以吸收水分。經過上網搜尋後，發現有叫做脯胺酸(Proline)的一種胺基酸，它能幫助提升植物自體的滲透壓。所以我們檢測小米與水稻體內的脯胺酸含量，了解他們在鹽逆境下生長狀況的差異。



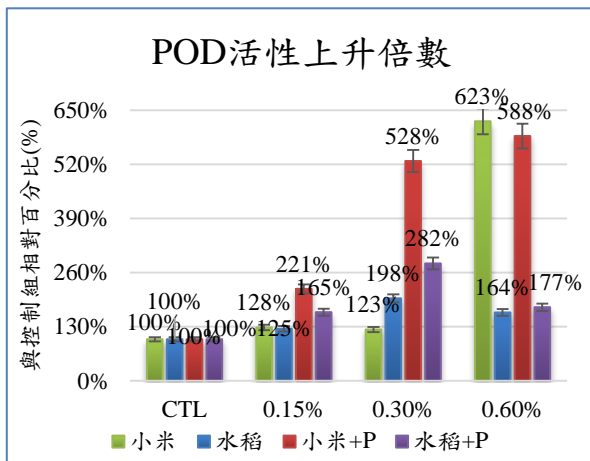
(圖十三)脯胺酸(Proline)含量變化

由(圖十三)，我們可以發現小米的脯胺酸含量在越高濃度的鹽逆境中，有隨著濃度上升的趨勢，因此能夠維持它的高滲透壓環境中的吸收能力；而水稻的脯胺酸含量在 0.15% 鹽逆境中最高，上升倍數甚至超越小米在 0.15% 鹽逆境中的情形，但是在更高濃度的鹽逆境中，含量反而隨之降低。我們推測這是因為水稻對於鹽逆境敏感度低導致本身的抗氧化機制無法及時啟動，如氣孔的閉合，而在水分減少的情況下，水稻會在此時為了大量提升滲透壓而增加本身的脯胺酸含量，以維持生長；但在更高濃度鹽逆境下，水稻已無法負荷逆境造成的氧化壓力，導致水稻提升脯胺酸的能力降低。

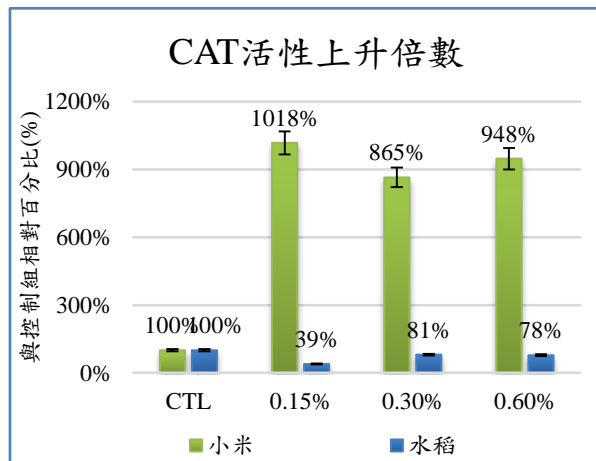
在閱讀文獻之後，我們也了解到脯胺酸可以影響到抗氧化酵素的活性，所以我們在環境中加入脯胺酸並檢測植物體內抗氧化酵素活性的變化。

## (二)比較小米與水稻在不同鹽逆境下體內的過氧化酵素活性：

我們發現將小米與水稻種植在鹽逆境中之後，植物體內會有過氧化物質的累積。而植物為了要對抗過氧化物質，體內會啟動過氧化酵素來清除過氧化物質。而其中最常被拿來做實驗的是過氧化酶(POD)與過氧化氫酶(CAT)，因此我們便檢測這兩種酵素活性變化，以了解這兩種酵素的活性變化對於小米與水稻在鹽逆境下的生長有何影響。同時我們在搜尋文獻之後，發現脯胺酸可以影響到抗氧化酵素的活性，這裡我們先比較了容易檢測的過氧化酶(POD)。



(圖十四)過氧化酶活性變化

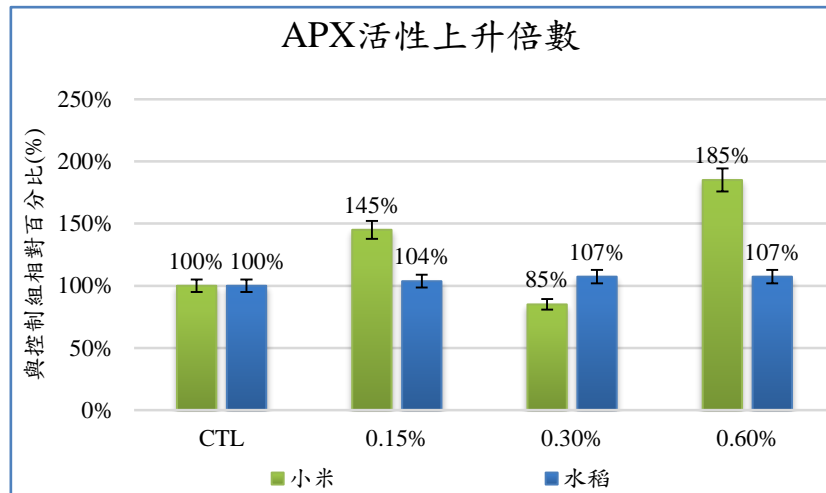


(圖十五)過氧化氫酶活性變化

由(圖十四)可知，不論是小米或是水稻，在鹽逆境中的過氧化酶都會有上升的趨勢。但也能發現，小米在 0.6% 鹽逆境下，它的過氧化酶上升倍數較高，有 6.23 倍。而水稻雖也有上升的狀況，但是上升倍數沒小米高，只有 1.64 倍。在加入脯胺酸之後，我們發現到不論是小米或是水稻的過氧化酶含量都有明顯的上升。但是小米在 0.6% 鹽逆境下的過氧化酶活性卻是呈現維持的狀態，我們認為可能是因為過氧化酶的活性已經提升到最大，不能再提升了。

而由(圖十五)中，我們可以發現小米的過氧化氫酶活性會有急劇上升的狀況，甚至比原來還有著 8 倍以上的活性，但是水稻的過氧化氫酶活性卻呈現少於控制組的狀況，大約只剩 8 成，甚至在 0.15% 濃度下與控制組相比活性約剩 4 成。

除了常見的兩種過氧化酵素外，植物體內還會有維他命 C 氧化酶(APX)幫助植物渡過逆境。而這種酵素需要維他命 C 作為輔酶來清除植物體內的過氧化物。



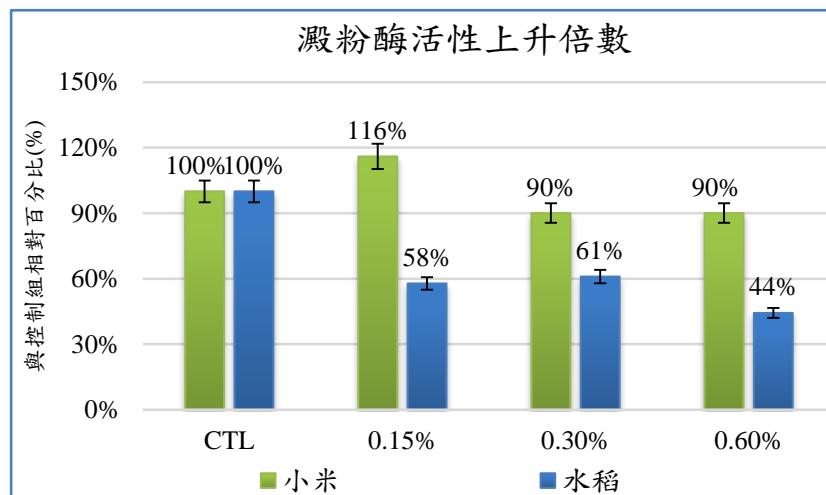
(圖十六)、維他命 C 氧化酶活性變化

由(圖十六)中，我們可以發現水稻的維他命 C 氧化酶活性變化不明顯，但是小米在逆境中卻有 1.5 倍甚至 2 倍的活性。

綜合以上三種過氧化酵素的活性變化，我們可以了解到小米之所以耐鹽能力較好的原因之一，是因為它體內的過氧化酵素活性在遇到逆境時會提升的緣故。使得小米可以更有效地清除體內較多過氧化物，以降低它在逆境下受到的氧化傷害。

(三)比較小米與水稻在不同鹽逆境下澱粉酶的活性：

我們測小米與水稻的澱粉酶活性的原因，是因為我們猜測澱粉酶將澱粉轉為單醣或雙醣有兩種目的。第一種是利用單醣或雙醣溶在植物根部的體液中以提升植物的滲透壓，使得植物能在高滲透壓的環境中生存；而第二種則是植物在逆境下分解澱粉轉為能量，以維持本身生長需求。

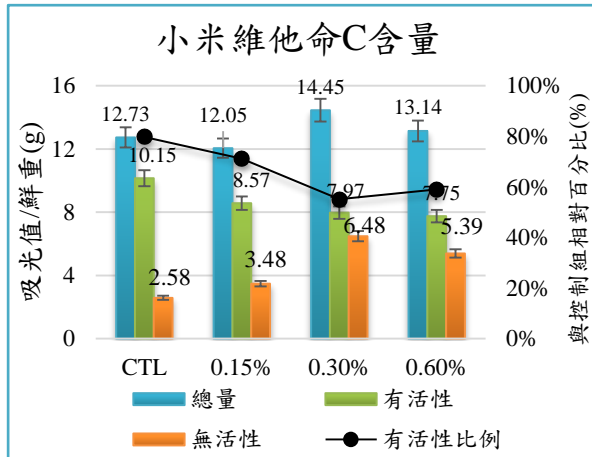


(圖十七)澱粉酶活性變化

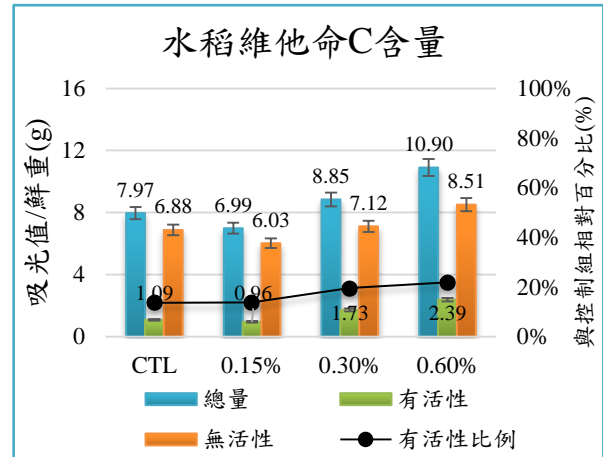
在(圖十七)中，我們可以看到，小米的澱粉酶活性不論是在何種濃度的鹽逆境濃度中都沒有顯著變化。而水稻的澱粉酶活性，在 0.15% 鹽逆境中開始下降，且隨著鹽逆境濃度的提升，下降的愈多。我們閱讀文獻(Journal of Biological Sciences)後，推測水稻會有這種狀況是因為鹽逆境中的鈉離子改變了澱粉酶的結構而使得其活性降低。

(四)比較小米與水稻在不同鹽逆境下的維他命 C 含量：

植物體內含有維他命 C，可以幫助植物抗氧化。而其中又分為有活性的氧化態與無活性的還原態。為了比較兩者間的差異，我們在這裡檢測了兩者的含量。



(圖十八)小米維他命 C 含量變化



(圖十九)水稻維他命 C 含量變化

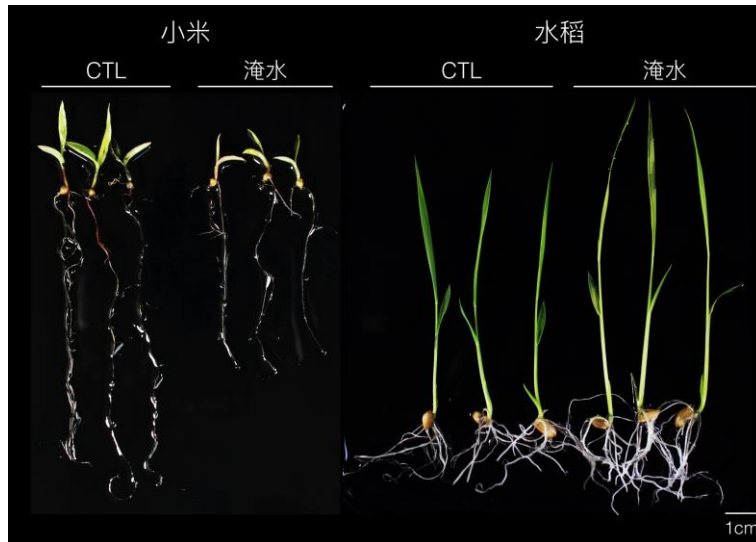
由(圖十八)與(圖十九)之中，我們可以得知小米與水稻的維他命 C 總含量在鹽逆境下不會有明顯的變化，但是我們可以明顯的發現到小米有活性的維他命 C 比起水稻多出不少。隨著鹽濃度的提升，小米有活性的維他命 C 含量沒有明顯的減少，不過無活性的維他命 C 到是有增加許多。而水稻在越高濃度的鹽逆境之下，也有許小米幾乎相同的趨勢。

另外，抗氧化酵素之一的維他命 C 氧化酶(APX)是以維他命 C 作為輔酶來幫助植物抗氧化，但在我們的實驗數據中沒有看到明顯的關聯，我們認為可能維他命 C 氧化酶的活性在鹽逆境下不是受到維他命 C 的調控，又或許是因為維他命 C 氧化酶的結構遭受到鹽逆境的改變或破壞。

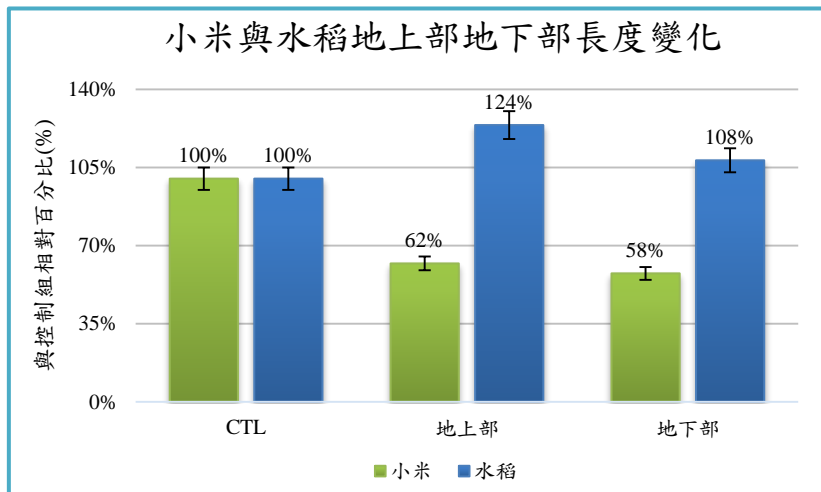


#### 四、 小米與水稻在淹水逆境下的外型比較：

從上述的實驗中，瞭解到小米在鹽逆境中，不管是脯胺酸、澱粉酶、抗氧化酵素...等，表現的都比水稻還要好。但水稻是生活在水田裡的，那小米是否可以在淹水逆境生長好呢？因此我們將小米與水稻種植在淹水逆境中的差異。



(圖二十)小米與水稻在淹水逆境下生長狀況



(圖二十一)小米與水稻在淹水逆境下地上、地下部長度變化

在(圖二十)、(圖二十一)可以看到，小米在淹水後 8 天的形態有明顯的差異。首先我們觀察地上部，小米在淹水後，葉子略泛黃白化，並且淹水處理後的地上部長度比控制組少了 38%。接著比較地下部的根長，可以發現，淹水處理後的小米根部長度較控制

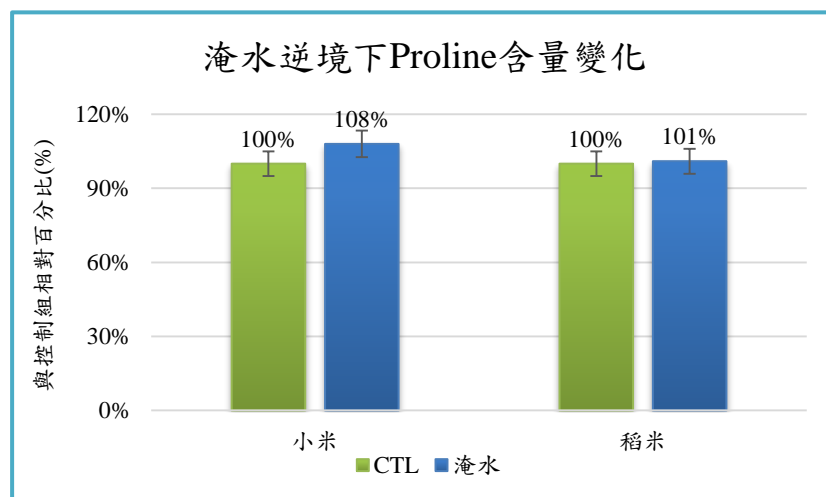
組短了 42%，大約相差 2 倍。而淹水逆境則對於小米的側根數量沒有明顯影響。

相反地，經過淹水 8 天的逆境後，水稻的地上部有抽高的現象，比起控制組的葉長多了 24%。而水稻根長的長度雖然並沒有明顯增長，只比控制組多了 8%，但是側根數卻有明顯的增加。

根據以上觀察到的結果可以得知：淹水逆境下，小米的生長狀況受到了抑制，而水稻則沒有受到抑制，甚至促進了生長。

#### 五、 小米與水稻在淹水逆境的脯胺酸含量差異

我們在閱讀文獻後發現植物會在許多逆境下累積脯胺酸來對抗逆境，那是否將小米種植在水稻耐受性較佳的淹水逆境中也會使兩者的脯胺酸提升呢？



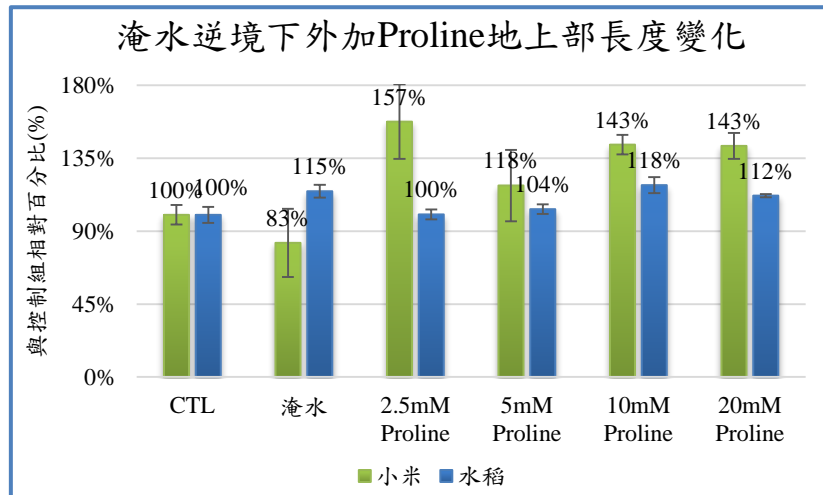
(圖二十二)小米在淹水逆境下的 Proline 含量變化

由(圖二十二)可知，不論是小米或是水稻在淹水逆境下，其體內的脯胺酸沒有明顯的上升趨勢。我們認為有兩個可能，第一個是脯胺酸本身並無法提升小米的耐淹力，所以就不耗費能量去啟動;而第二個則是脯胺酸其實是可以幫助小米，但在淹水逆境下卻無法累積

而水稻的脯胺酸沒有上升，因此我們推測水稻在淹水逆境下並不是透過脯胺酸來幫助它在淹水逆境下生存。

## 六、 在淹水逆境加入脯胺酸後小米與水稻外型變化

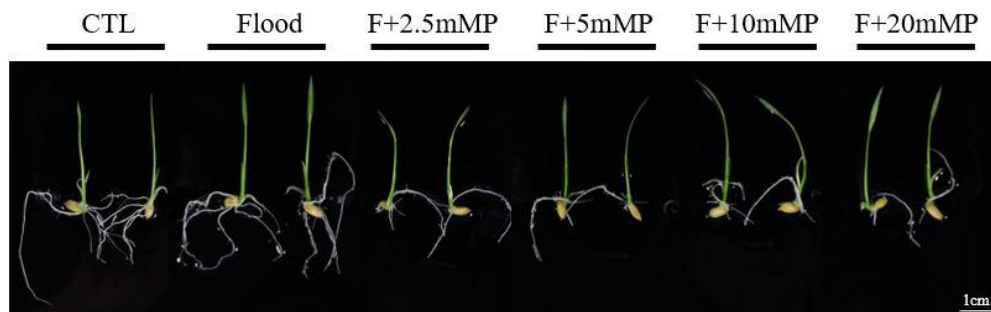
對於脯胺酸在兩者體內皆沒有提升，我們做出了兩個假設。第一是因為脯胺酸無法幫助它們在淹水逆境下生存；第二則是淹水逆境無法啟動它們在淹水逆境下的脯胺酸合成機制。



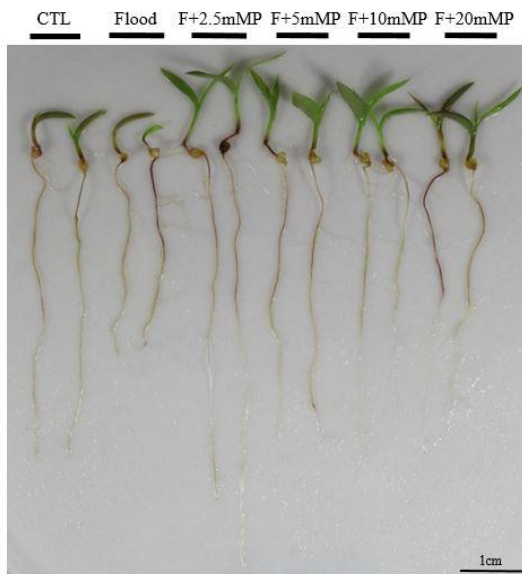
(圖二十三)外加 Proline 後植物地上部長度變化

由(圖二十三)可知，外加脯胺酸後小米的生長狀況有明顯的提升，因此可了解到，脯胺酸可以幫助小米在淹水逆境下抵抗逆境，但是小米卻無法在淹水逆境下合成。可能是因為其脯胺酸的合成機制無法被淹水逆境啟動。

而水稻則在外加脯胺酸也沒有生長上的明顯差異，由此可知脯胺酸對於水稻在淹水逆境的生存並無幫助，因此其不會消耗能量來合成脯胺酸。



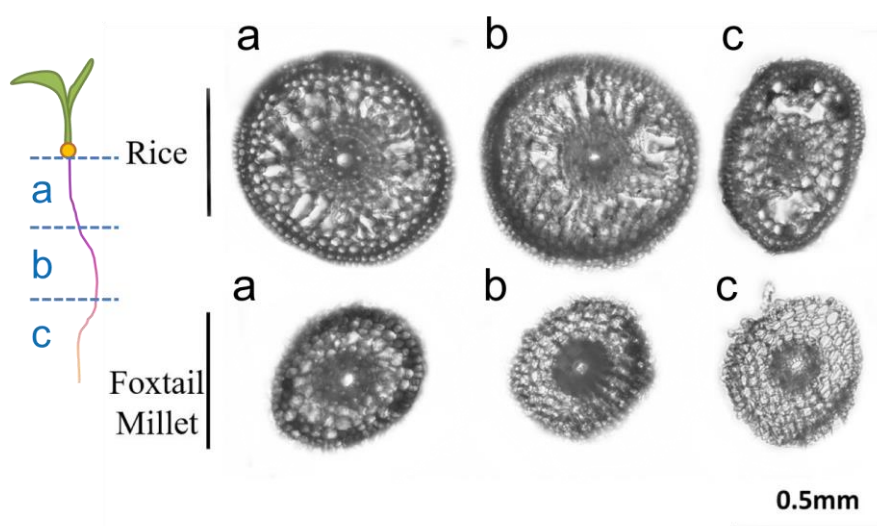
(圖二十四)外加脯胺酸後小米淹水逆境下生長狀況變化(F=淹水、P=脯胺酸)(處理 3 天)



(圖二十五)外加脯胺酸後稻米淹水逆境下生長狀況(F=淹水、P=脯胺酸)(處理 3 天)

### 七、淹水逆境底下小米與水稻通氣組織差異

既然水稻不是透過脯胺酸來增強其在淹水逆境下的生存力，那是如何使其比小米更適合在淹水逆境下生存呢？淹水逆境會使植物缺氧，而根部若有通氣組織便可使其的根部在淹水逆境下呼吸。



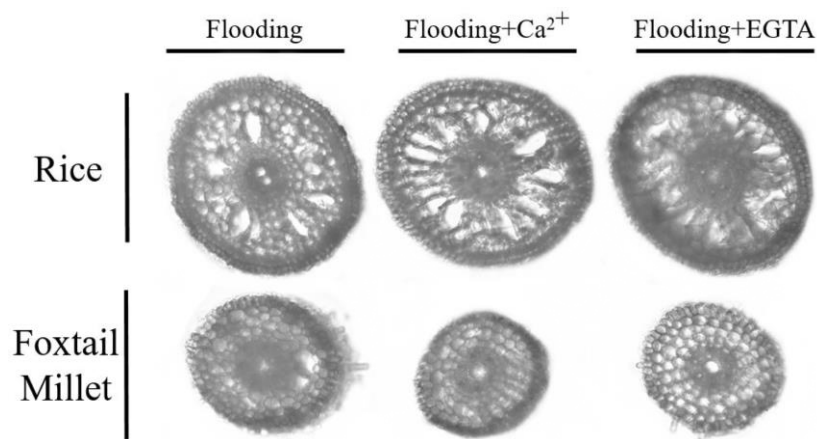
(圖二十六)小米與水稻通氣組織差異(淹水處理 3 天)

從(圖二十六)根部橫切面可發現，小米並沒有通氣組織的形成，但是水稻的通氣組織非常的明顯。使得小米在淹水逆境下缺氧狀況非常嚴重，然而水稻卻能使氣體通入根部中而增加它的生存力。

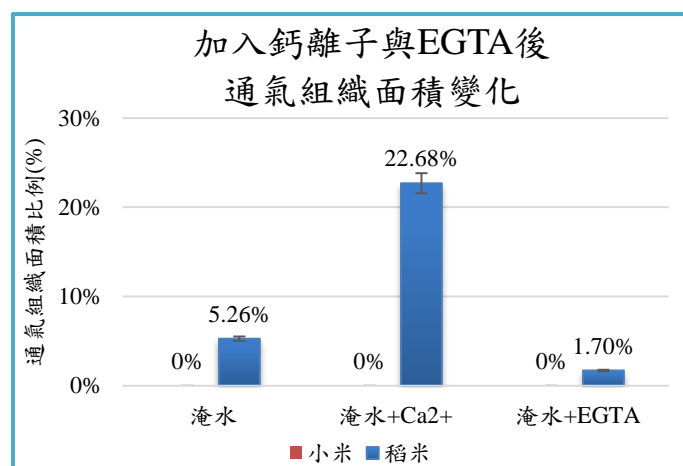
我們推測，這是小米與水稻對淹水逆境耐受性有別的主要差異。

#### 八、 加入鈣離子後的通氣組織狀況與生長狀況

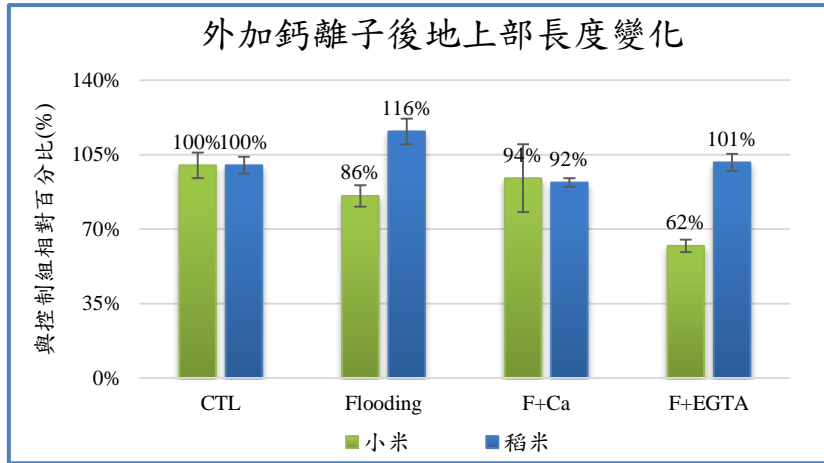
我們認為，小米與水稻對淹水逆境耐受性不同的主要差異應是通氣組織。為了使小米產生通氣組織，我們經由上網搜尋後，發現鈣離子可以促進通氣組織的形成。於是我們便在環境中加入鈣離子和鈣離子螯合劑 (EGTA) 來觀察它們通氣組織的形成情形與生長狀況。



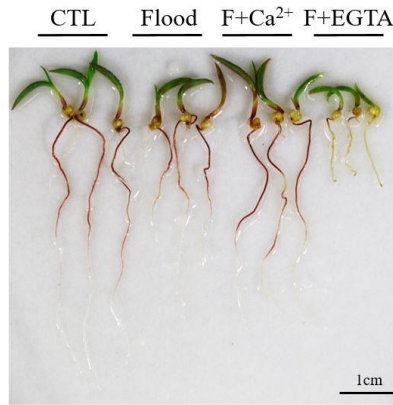
(圖二十七)加入鈣離子或 EGTA 後小米與水稻通氣組織差異(淹水處理 3 天)



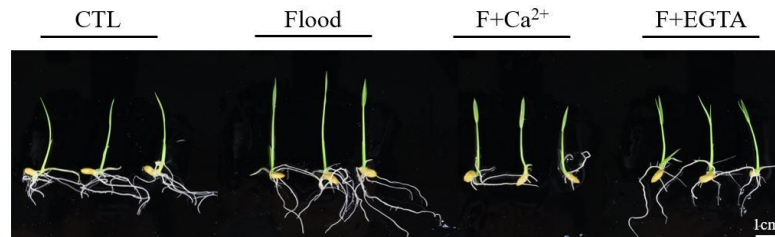
(圖二十八)加入鈣離子或 EGTA 後小米與水稻通氣組織面積變化(淹水處理 3 天)



(圖二十九)加入鈣離子、EGTA 後小米與水稻生長狀況差異(F=淹水)(淹水處理 3 天)



(圖三十)加入鈣離子、EGTA 後小米生長狀況差異(F=淹水)(淹水處理 3 天)



(圖三十一)加入鈣離子、EGTA 後水稻生長狀況差異(F=淹水)(淹水處理 3 天)

由(圖二十七)和(圖二十八)我們可以得知在加入鈣離子後，水稻的通氣組織變多；加入 EGTA 後，水稻通氣組織變少。至於小米，則不論加入鈣離子或 EGTA 皆不會使其形成通氣組織。由此可知，小米並沒有鈣離子誘導通氣組織形成的這條途徑。

而根據(圖二十九)和(圖三十)，我們發現不論是加入鈣離子或 EGTA 對於水稻的生長狀況皆沒有明顯的變化。但小米在加入鈣離子後的生長狀況明顯變好，而加入 EGTA 則會使其的生長狀況變差。可知鈣離子可以啟動某項小米在淹水逆境下的生存機制。

## 陸、討論

### 一、 比較小米與水稻耐鹽能力

根據小米與水稻的生長情況，我們可以看到，小米在鹽逆境處理下的葉長與根長的生長情形都比水稻佳。而比起控制組，小米在鹽逆境下所縮減的葉長與根長都較水稻縮減的少。

### 二、 型態探討小米與水稻的生存機制

由氣孔的開合情形，我們可以發現小米在較低鹽濃度中氣孔就會關閉，但水稻卻要等到較高濃度的鹽逆境中，氣孔才會有關閉的現象。我們推測這是因為小米比起水稻對於鹽逆境較敏感，因而提早關閉氣孔，以防體內水分蒸散過多。由於鹽逆境與乾旱逆境皆為高滲透壓的環境，會讓植物難以吸收環境中的水分與養分，而氣孔開啟時會蒸散植物體內的水分，在難以吸收水分的環境下，體內水分又被蒸散，自然會使植物難以生存。

閱讀文獻後，我們了解到光合作用的產物 NADPH 會影響脯胺酸(Proline)的製造。而我們發現在鹽逆境下，小米地上部的生長狀況較水稻好，所以我們推測這代表鹽逆境下的小米光合作用較水稻來的佳，所以使得小米體內脯胺酸的累積較水稻多。

### 三、 抗氧化機制在小米與水稻上的差異

在觀察小米與水稻的外觀中，可以發現小米有花青素累積的現象，但水稻卻沒有這個情形。從文獻我們可以看出植物平時會利用光合作用合成類黃酮，經代謝產生能量後形成花青素。我們發現在鹽逆境下花青素的累積會隨濃度上升而減少，而因為花青素的結構中含有氫氧基，可以被植物當成抗氧化物質消耗掉。所以我們推測小米之所以比起水稻更加耐鹽的原因之一是因為小米有花青素累積的現象，因此可以將其當作抗氧化物質來減少逆境中小米的氧化傷害。

我們在檢測小米與水稻體內的抗氧化酵素後，發現不論是過氧化酶(POD)、過氧化氫酶(CAT)或維生素 C 氧化酶(APX)，小米活性的上升倍數都較水稻多。由此我們推測其因為抗氧化酵素有著較高的倍數，所以它耐鹽能力較強。

另外，我們也可以發現小米的脯胺酸(Proline)含量較水稻來的多。在閱讀文獻後，我們得知脯胺酸有著可以清除過氧化物並增強抗氧化酵素(如 POD、CAT)活性的功能。而小米之所以 0.3% 鹽逆境中的抗氧化酵素活性比起 0.15% 鹽逆境中來的低，我們推測是因為脯胺酸可以幫助抗氧化，所以當小米在 0.3% 鹽逆境中，脯胺酸有所上升，抗氧化酵素的活性便不須上升過多便可以應付鹽逆境了。

#### 四、 小米與水稻在對抗滲透壓逆境的差異

觀察氣孔時，我們發現到水稻比起小米需在更高濃度的鹽逆境中氣孔才會關閉。因為鹽逆境是屬於高滲透壓的環境，因此小米與水稻會難以吸收水分與養分。但小米一遇到鹽逆境時就會將氣孔關閉，減少水分的蒸散；而水稻卻要到較高濃度的鹽逆境中才有氣孔關閉的現象，由此我們可以得知小米比水稻對於鹽逆境的敏感度更高，讓小米能夠及早啟動抗逆境的機制。

由我們的實驗結果中，可以發現到小米比起水稻擁有著更多的脯胺酸(Proline)含量，而脯胺酸可以增加植物的滲透壓，幫助植物可以在高滲透壓的環境中吸收到水分與養分，使其在高滲透壓的環境中維持生長。因此可以從脯胺酸含量看出，小米比水稻具有更佳的鹽逆境耐受性。

我們還發現小米比起水稻，它的澱粉酶活性較高。澱粉酶會將植物體內所累積的澱粉分解成單醣與雙醣，溶於植物的體液後，增加它的滲透壓，並使其在高滲透壓環境中可以更容易吸收水分。因為小米的澱粉酶活性較高，能夠更有效的提升本身的滲透壓，因此小米在鹽逆境環境中就會生長得較水稻佳。



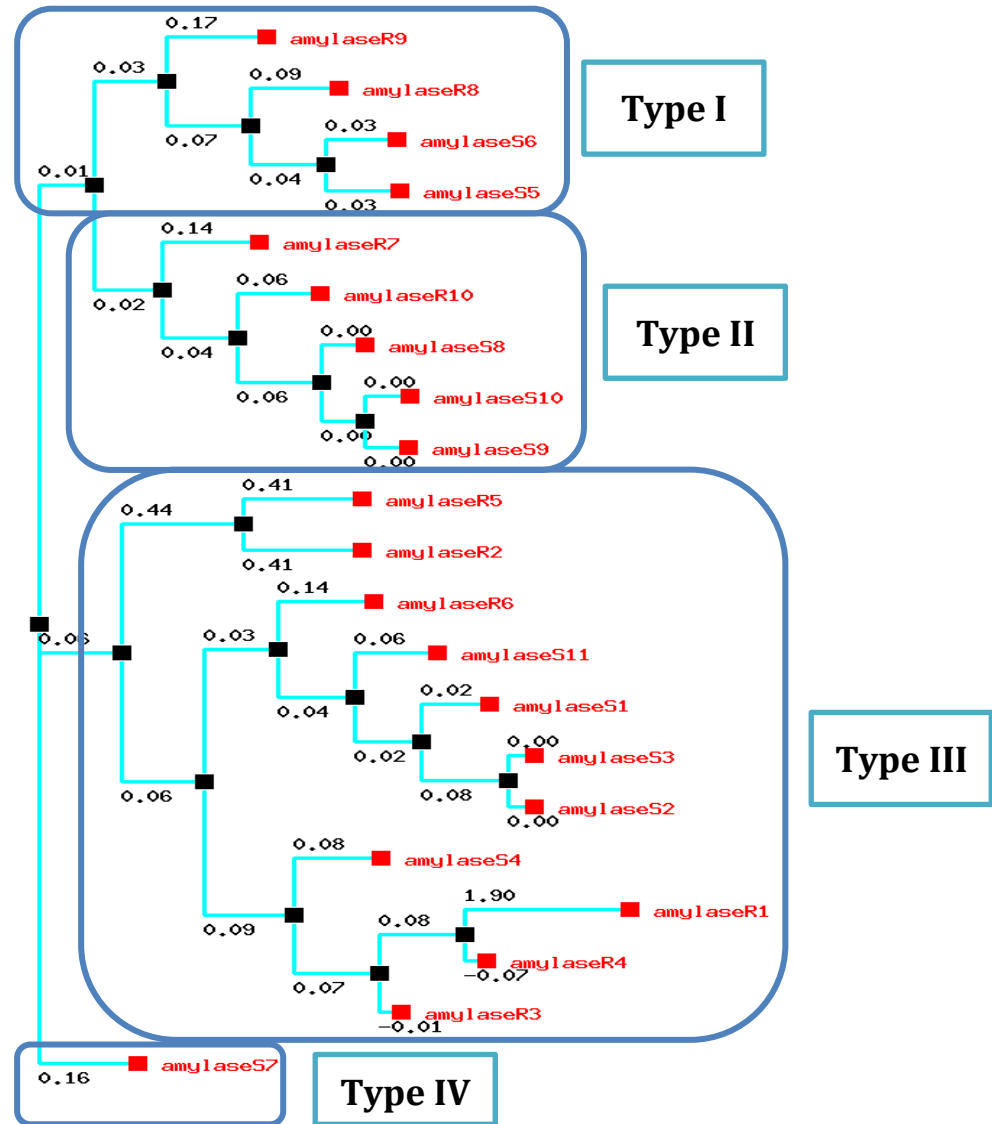
## 五、 小米與水稻在鹽逆境下能量代謝的差異

我們閱讀文獻後，我們發現光合作用時，將 NADPH 轉換成 NADP 和  $H^+$  時的能量會幫助脯胺酸的合成。而澱粉酶可以將澱粉分解成單醣與雙醣來提供植物體能量，我們經由實驗可以了解到小米的澱粉酶活性較水稻高，因此我們推測小米澱粉酶活性高能提供較多能量使小米合成更多脯胺酸。因此水稻在抵抗鹽逆境的能力上較小米差。

## 六、 小米與水稻在鹽逆境下澱粉酶活性差異

從實驗的結果中，我們發現到小米在鹽逆境下的澱粉酶活性比起水稻是來的高的。這可能是因為小米自古便生長在乾旱或高鹽等高滲透壓的環境，因此體內的酵素也演化成較不容易受鹽逆境等高滲透壓逆境破壞的狀況。同時也因為如此，使得小米可以分解較多的澱粉來產生能量，以使其活在鹽逆境下。

## 七、 小米與水稻的胺基酸序列差異



(圖三十) Power Operation 分群結果

根據實驗結果，可以了解到小米和水稻的澱粉酶活性有明顯的不同。所以我們推測，可能是因為澱粉酶的基因表現不一樣，又或是他們的蛋白質結構有所不同，使小米的澱粉酶在高鹽環境下仍能維持活性，而我們這次針對澱粉酶的蛋白質結構做討論。首先，上網查了小米和水稻的澱粉酶胺基酸序列，並將其編號，10 個水稻  $\alpha$ -澱粉酶蛋白質序列分別用 amy1aseR1 到 amy1aseR10 表示，小米則用 S 表示，11 個小米  $\alpha$ -澱粉酶蛋白質序列分別用 amy1aseS1 到 amy1aseS11 表示，編號所對應到的 Locus 呈現在附錄中。接著利用 Power Operation 將所有序列進行比對並分成四大群。

CLUSTAL O(1.2.2) multiple sequence alignment

```

amylaseR9 -----MKQMAALCGFLVALLWLTP
amylaseR8 MPPDVEVIRHEHIDHPSSTRDRSVVVSNSLSNTVSAYTDMKNTSSLCLLLVLLCSL--
amylaseS5 -----MKHSSSLGFLFLALCSL--
amylaseS6 -----MKHSSSLGLFLALCSL--
                    *  *  *  *  *  *

amylaseR9  DVAHAQTQILFQGFNWSWKKQGGWYMLKDQVGDIASAGVTHVWLPPTTHSVSPQGYP
amylaseR8  TCNSGQAVLQFQGFNWSWKKQGGWYMLKQVDDIAKAGVTHVWLPPTSHSVAPQGYMP
amylaseS5  ---VQAQVLFQGFNWSWCKQGSWYNSLNAQVDDIAKAGVTHVWLPPTSHSVSPQGYP
amylaseS6  ---VQAQVLFQGFNWSWCKQGGWYNSLNAKAVDDIAKAGVTHVWLPPTSHSVSPQGYMP
                    *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

amylaseR9  GRLYDLNASKYGTAKELSLIAAFHAKGKICVADIVNHRCADDKDGRGVYCFKGGGR
amylaseR8  GRLYDLNASKYGTAAELKSLIAAFHAKGKICVADIVNHRCAEKDKDARGVYCFEGGTPD
amylaseS5  GRLYDLNASKYGTAVELKSLIAAFHRRGIQCVADIVNHRCADKDKDARGVYCFEGGTPD
amylaseS6  GRLYDLNASKYGTAAELKSLIAAFHRRGIQCVADIVNHRCADKDKDARGVYCFEGGTPD
                    *****

amylaseR9  GCLDWGPMICDDTQYSQDGTGHRDGTGADFAAAPDIDHNLPLVQRELSDWLWLRDVG
amylaseR8  DRLDWGPCMICDDTQYSQDGTGHRDGTGEGGAAPDIDHNLPLVQRELSDWLWLRDVG
amylaseS5  DRLDWGPCMICDDTQYSQDGTGHRDGTGEGGAAPDIDHNLPLVQRELSDWLWLRDVG
amylaseS6  ERLDWGPCMICDDTQYSQDGTGHRDGTGEGGAAPDIDHNLPLVQRELSDWLWLRDVG
                    *****

amylaseR9  DGWRLDFAKGSAAVARTYVQNRPSFVVAEIIWNSLSYDGGKPSAANQDQRQELVNWVK
amylaseR8  DGWRLDFAKGSSTIAKMYVESCKPFGVVAEIIWNSLSYDGGKPSAANQDQRQELVNWVN
amylaseS5  DGWRLDFAKGSATIKMYVENSXPSFVVAEIIWNSLSYDGGKPSAANQDQRQELVNWVQ
amylaseS6  DGWRLDFAKGSATIAKMYVNTKPSFVVAEIIWNSLSYDGGKPSAANQDQRQELVNWVQ
                    *****

amylaseR9  QVGGPATAFDFTTKGILQAVQELWRMRDKGKAPGMIGWPEKAFTVDNHDGTGQK
amylaseR8  AVGGPAMTFFDTTKGILQAVQELWRMRDKGKAAAGMIGWPEKAFTVDNHDGTGQK
amylaseS5  AVGEPAMAFDFTTKGILQAVQELWRMRDSSKAAAGMIGWPEKAFTVDNHDGTGQK
amylaseS6  AVGKPMAMAFDFTTKGILQAVQELWRMRDSSKAAAGMIGWPEKAFTVDNHDGTGQK
                    *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

amylaseR9  MWPPFSDKVMQGYAYILTHPGVPCIFYDHFVWNLKQEIATAAIRRNGIHAGSKLRVL
amylaseR8  LWPPFSDKVMQGYAYILTHPGVPCIFYDHFVWNLKQEIATAAIRRNGIHAGSKLRIV
amylaseS5  MWPPFSDKVMQGYAYILTHPGVPCIFYDHFVWNLKQEIATAAIRRNGIHAGSKLRIL
amylaseS6  LWPPFSDKVMQGYAYILTHPGVPCIFYDHFVWNLKQEIATAAIRRNGIHAGSKLRIL
                    *****

amylaseR9  AAESDMYVAMVERVIKIPRIDVGNVIPSDFHVAHGNQYCWWEKSGLRVPEPEGRR
amylaseR8  VADADAYVAVVDEKVMYKIGTRYDVGNAVPSDFHQTVHKGYSWVEKSGLRVPAGRHL-
amylaseS5  LADADAYVAVVDEKVMYKIGTRYDVGNIIPSDFHVAHGNQYCWWEKSGLRVPEGRHL-
amylaseS6  LADDDAYVAVVDEKVMYKIGTRYDVGNIIPSDFHVAHGNQYCWWEKSGLRVPEGRHL-
                    *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

```

CLUSTAL O(1.2.2) multiple sequence alignment

```

amylaseR7  MGKHHVTLCCV-VFVAVLCLASSLAQAVLQFQGFNWSWKKQGGWYMLHEKVEEIASTGA
amylaseR10 MAKRIASMSLLIALLCLSSHLAQVLFQGFNWSWKKQGGWYMLHGHVDDIAATGV
amylaseS9  MAKHSAAMCSLLMLVLLGLGSLAQVLFQGFNWSWKKQGGWYMLGRVDDIAATGA
amylaseS8  MAKHSAAMCSLLMLVLLGLGSLAQVLFQGFNWSWKKQGGWYMLGRVDDIAATGA
amylaseS10 MAKHSAAMCSLLMLVLLGLGSLAQVLFQGFNWSWKKQGGWYMLGRVDDIAATGA
                    *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

amylaseR7  THVWLPPTSHSVSPQGYMPGRLYDLNASKYGTAEELSLIAAFHAKGKICVADIVNHR
amylaseR10 THVWLPPTSHSVSPQGYMPGRLYDLNASKYGTAEELSLIAAFHAKGKICVADIVNHR
amylaseS9  THVWLPPTSHSVSPQGYMPGRLYDLNASKYGTAEELSLIAAFHAKGKICVADIVNHR
amylaseS8  THVWLPPTSHSVSPQGYMPGRLYDLNASKYGTAEELSLIAAFHAKGKICVADIVNHR
amylaseS10 THVWLPPTSHSVSPQGYMPGRLYDLNASKYGTAEELSLIAAFHAKGKICVADIVNHR
                    *****

amylaseR7  ADYKDSRGVYCFEGGTPDRDLWGPDMICSDDTQYSNGRHRDGTGADFAAPDIDHLNP
amylaseR10 ADYKDSRGVYCFEGGTPDRDLWGPDMICSDDTQYSNGRHRDGTGADFAAPDIDHLNP
amylaseS9  ADYKDSRGVYCFEGGTPDRDLWGPDMICSDDTQYSNGRHRDGTGADFAAPDIDHLNP
amylaseS8  ADYKDSRGVYCFEGGTPDRDLWGPDMICSDDTQYSNGRHRDGTGADFAAPDIDHLNP
amylaseS10 ADYKDSRGVYCFEGGTPDRDLWGPDMICSDDTQYSNGRHRDGTGADFAAPDIDHLNP
                    *****

amylaseR7  RVQRELTDWLNWLRDGLGDFGWRDPAKGSAAVAIVYVNDIPPTVVAEIIWNSLQDGN
amylaseR10 RVQRELTDWLNWLRDGLGDFGWRDPAKGSAAVAIVYVNDIPPTVVAEIIWNSLQDGN
amylaseS9  RVQRELTDWLNWLRDGLGDFGWRDPAKGSAAVAIVYVNDIPPTVVAEIIWNSLQDGN
amylaseS8  RVQRELTDWLNWLRDGLGDFGWRDPAKGSAAVAIVYVNDIPPTVVAEIIWNSLQDGN
amylaseS10 RVQRELTDWLNWLRDGLGDFGWRDPAKGSAAVAIVYVNDIPPTVVAEIIWNSLQDGN
                    *****

amylaseR7  GKPSTNQDADRQELVNWVEGKVPATAFDFTTKGILQAVQELWRMRDKGKAPGMIGW
amylaseR10 GEPSSIQDKDRQELVNWVAQVGGPAAAFDFTTKGILQAVQELWRMRDKGKAPGMIGW
amylaseS9  GEPSSIQDKDRQELVNWVAQVGGPAAAFDFTTKGILQAVQELWRMRDKGKAPGMIGW
amylaseS8  GEPSSIQDKDRQELVNWVAQVGGPAAAFDFTTKGILQAVQELWRMRDKGKAPGMIGW
amylaseS10 GEPSSIQDKDRQELVNWVAQVGGPAAAFDFTTKGILQAVQELWRMRDKGKAPGMIGW
                    *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

amylaseR7  MPDQAVTFVDNHDGTGQKSLWFFPSDKVMQGYAYILTHPGVPCIFYDHFVWNLKQEIAT
amylaseR10 LPEKAVTFVDNHDGTGQKSLWFFPSDKVMQGYAYILTHPGVPCIFYDHFVWNLKQEIAT
amylaseS9  LPEKAVTFVDNHDGTGQKSLWFFPSDKVMQGYAYILTHPGVPCIFYDHFVWNLKQEIAT
amylaseS8  LPEKAVTFVDNHDGTGQKSLWFFPSDKVMQGYAYILTHPGVPCIFYDHFVWNLKQEIAT
amylaseS10 LPEKAVTFVDNHDGTGQKSLWFFPSDKVMQGYAYILTHPGVPCIFYDHFVWNLKQEIAT
                    *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

amylaseR7  IAEVRSRNGIHAGSKLIDLAADGDLVYAKIDDKVIVKIGSRYDVGMLIPDFPHIAGHNN
amylaseR10 IAEVRSRNGIHAGSKLIDLAADGDLVYAKIDDKVIVKIGSRYDVGMLIPDFPHIAGHNN
amylaseS9  IAEVRSRNGIHAGSKLIDLAADGDLVYAKIDDKVIVKIGSRYDVGMLIPDFPHIAGHNN
amylaseS8  IAEVRSRNGIHAGSKLIDLAADGDLVYAKIDDKVIVKIGSRYDVGMLIPDFPHIAGHNN
amylaseS10 IAEVRSRNGIHAGSKLIDLAADGDLVYAKIDDKVIVKIGSRYDVGMLIPDFPHIAGHNN
                    *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

amylaseR7  YCWWEKSGLRVPEGRHH
amylaseR10 YCWWEKSGLRVPEGRHH
amylaseS9  YCWWEKSGLRVPEGRHH
amylaseS8  YCWWEKSGLRVPEGRHH
amylaseS10 YCWWEKSGLRVPEGRHH
                    *****

```

(圖三十一)胺基酸序列，圖左方為 Type I 右方為 Type II

再來，我們將 4 大群個別用 Alignment 進行分析比對，比對完後，找尋特定的胺基酸。我們去找尋特定胺基酸位置，這些位置是在小米內使用相同胺基酸，但水稻卻使用不同胺基酸的位置。按照上面的條件，在第 1 群(Type I)和第 2 群(Type II)中找到了上圖中的這些位置。在這圖片的咖啡色框框中，小米在這些位置的胺基酸是蘇胺酸(T)和絲胺酸(S)，這兩種胺基酸含有氫氧基，是蛋白質常被磷酸化修飾的位置，能改變結構並且影響活性，因此我們推測，這些特殊的位置便能使小米維持其澱粉酶的活性。

在我們查詢前人的實驗後，也了解到圖中被箭頭標示的這兩個胺基酸是澱粉酶的活化位，分別是天門東胺酸(D)與谷胺酸(E)。並代表其周圍的胺基酸組成可能影響蛋白質的活性。在這些藍色框框位置中，小米的胺基酸相同，並與水稻不同。所以我們推測可能是因為這些位置，使小米的澱粉酶能保持活性。

對於以上的推論，我們須做實驗來應證。

## 七、 光合作用與抗氧化酵素間的關係

小米因在鹽逆境下生長較為良好，所以可能使其光合作用效率也較高。進而使得光合作用的產物 NADPH，可以幫助合成較多脯胺酸。在我們閱讀文獻後，我們發現到脯胺酸的含量也與抗氧化酵素的活性有所相關，脯胺酸越多，抗氧化酵素的活性越強。同時，經過我們實驗的驗證，在環境中加入脯胺酸後，POD 的活性有明顯受到提升。不過小米在 0.6% 鹽逆境之下的 POD 沒有明顯提升，這可能是因為他的活性已經提升到最大，或是代表脯胺酸提升過氧化酵素的能力是有極限的。

## 八、 淹水逆境對於小米與水稻之影響

在鹽逆境的實驗中，小米能啟動抗氧化酵素、脯胺酸、澱粉酶...等，來增強它的耐受性。而淹水逆境的應對機制是什麼呢？在形態觀察上，我們能發現到水稻的生長比小米好出許多。因此我們推測，水稻可能藉由地上部的增長，使它突破了淹水區，得到充分的氧氣進行有氧呼吸，同時也能讓它進行光合作用。至於小米則因整個植株泡在水中，無法獲得足夠的氧氣，同時因為光線不足，光合作用的效率也可能因此變差，使得小米在淹水逆境下，生長得比水稻還要不好。

## 九、 淹水逆境對於小米與水稻脯胺酸含量影響

我們發現小米和水稻的脯胺酸在淹水逆境下皆不會上升。因此我們提出兩種假設：第一種是小米的脯胺酸合成機制不會遭淹水逆境啟動，第二種則是脯胺酸對小米在淹水

逆境下生存沒有幫助。而在我們加入脯胺酸在環境之中後，發現可以幫助小米抵抗淹水的逆境。因此可以驗證，小米的脯胺酸合成機制是不會被淹水逆境啟動的。

另外，先前所提到的小米生長狀況變差，也使得其光合作用效率變差，導致可協助合成脯胺酸的 NADPH 變少，因此也使得脯胺酸合成能力下降。至於小米脯胺酸合成的啟動值究竟為何，還需要做進一步的確認。

#### 十、 鈣離子對淹水逆境底下小米與水稻的影響

我們在加入鈣離子後，雖然沒有發現到小米出現通氣組織，但是我們卻明顯看到它的生長狀況變好。我們推測這是因為鈣離子可以在淹水逆境下啟動某項生存機制，同時我們也有發現小米花青素的累積變多，可能就是這個原因使其可以抵抗淹水逆境下的氧化傷害，來幫助其的生存。

而鈣離子卻不會幫助水稻在淹水逆境下的生存狀況，加入鈣離子螯合劑也不會使其生長狀況變差太多。我們認為這是因為通氣組織需要有一個適當的量，面積太大或太小都會使水稻在淹水逆境下的生長狀況變差。加入鈣離子可能會使其形成過多通氣組織導致運送能量上的困難，而加入鈣離子螯合劑則因其通氣組織的形成量是足夠的，仍可使其根部在淹水逆境下呼吸而不會使其生長狀況變差過多。

#### 十一、 未來展望之討論：

總觀本實驗的結果，我們可以瞭解到小米比起水稻有著更好的鹽逆境耐受性。但就論現實層面而言，水稻仍比起小米更受到大眾重視，因為它是現在亞洲地區多數人的主食。如果未來有機會，我們希望可以深入了解小米與水稻基因不同的部分，讓我們可以找出小米為何可以比水稻有更佳逆境耐受力且更易在惡劣環境中生長的原因。並且利用小米的基因來培育出耐鹽性強，生長能力更佳的水稻。

至於淹水逆境方面，我們希望可以了解到鈣離子為何可以使小米在淹水逆境下生長狀況變佳，也希望可以找到更多水稻在淹水逆境下的生存機制。並且檢測小米與稻米在淹水逆境下的抗氧化酵素活性變化、花青素在淹水逆境下所扮演的角色。最後，希望可以用水稻的基因培育出耐淹的小米。

若有機會，我們也希望能探討小米和水稻在更多不同逆境下的生長能力差異，了解小米與水稻應對不同逆境時的生長反應，並再深入探討基因差異後，培育出逆境耐受性更佳的植物，並將其應用在氣候變遷的環境下。

## 柒、結論



(圖三十二)水稻小米鹽逆境下應對機制圖

經由這次實驗，我們可以發現小米比起水稻有著更好的鹽逆境耐受性。影響這點的原因包含外觀的花青素累積、根毛數量和長度差異與氣孔開合狀況，體內過氧化物質的累積差異、過氧化酵素的活性差異、提升滲透壓能力與維他命 C 含量的差異。

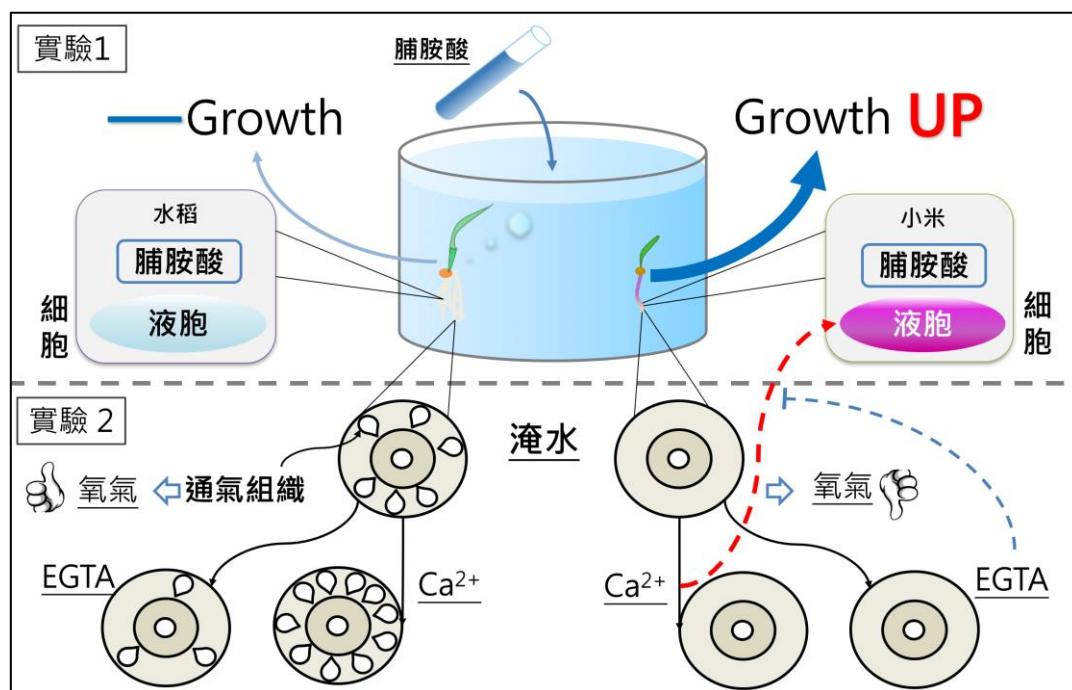
鹽逆境是屬於高滲透壓的環境，植物會難以吸收水分與養分。而小米之所以耐鹽性較水稻好的原因，從外觀上便能推測。我們觀察到小米的根有花青素累積的現象，而花青素的結構中含有氫氧基，可被當作抗氧化物質消耗，然而水稻卻沒有。除此之外，小米的根毛數也較水稻來的多，長度也較長。根毛多與長代表吸水表面積較大，更容易吸收到土壤中的水分與養分，因此小米才較能在鹽逆境中生長。

關於氣孔開合與過氧化物質累積這方面，我們從文獻中了解到水稻本身有著合成過氧化物質又將其分解掉的機制，而水稻降低過氧化物質的累積後，導致它無法立即啟動應對逆境的機制，因此當它處在逆境時對於逆境的敏感度較低使氣孔得在更高濃度鹽逆境中才關閉，除了環境本來就難以吸水外，加上不關閉氣孔而蒸散掉體內許多的水分，使水稻的生長狀況較小米差。

而在抗氧化的方面，可以發現小米的抗氧化酵素，不論是過氧化酶(POD)、過氧化氫酶(CAT)或是維他命 C 氧化酶(APX)，活性上升倍數都較水稻多。另外，維他命 C 同時也可以幫助植物抗氧化，而且還可以作為 APX 的輔酶。在我們的實驗中發現到小米有活性的比例是比水稻高出許多的。所以小米比起水稻可以清除更多對其生長造成傷害的過氧化物質。

同時提升滲透壓這方面對植物也是很重要的，因為鹽逆境是高滲透壓的環境，而植物為了生長，勢必得提升自己體內的滲透壓來吸水與養分。而脯胺酸(Proline)的累積和澱粉酶的活性上升狀況，我們發現小米在這些方面都比水稻要來的佳，所以在鹽逆境下也較容易吸水而不會使其缺少水分、養分而死。並且我們也在環境中加入脯胺酸這個實驗中，印證了脯胺酸的累積可以提升抗氧化酵素的活性。所以小米抗氧化酵素活性高的原因，一部份可能是受到脯胺酸的影響。





(圖三十三)水稻小米鹽逆境下應對機制圖

除了以上在鹽逆境下所觀察到的實驗結果，我們在淹水逆境中卻發現不論小米或水稻的脯胺酸不會有明顯上升，甚至可說是沒有變化。但是加入脯胺酸可以使小米的生長狀況變好，而水稻則沒有明顯變化。因此我們推測，淹水無法啟動小米合成脯胺酸來抵抗逆境的生存機制，而水稻則不是使用脯胺酸來抵抗淹水逆境。

另外，我們還對他們進行了根部切片，發現小米並不會形成任何通氣組織，而水稻則產生許多的通氣組織。因此我們認為，若使小米產生通氣組織，可以幫助其在淹水逆境下生存。在上網搜尋文獻後，我們發現鈣離子可以誘導通氣組織的形成。而加入了鈣離子之後，我們發現小米仍舊沒有通氣組織的產生，但是生長狀況卻會變好。相對的，加入了 EGTA 會使它的生長狀況變差。對水稻而言，加入鈣離子會使其通氣組織變多，加入 EGTA 則使其通氣組織變少。但是水稻的生長狀況不會因此而受到影響。

在最後，希望大眾可以多重視小米這個較耐鹽的植物，並將其作為主食食用。在全球氣候變遷的時代，有許多的植物無法適應環境的變遷而消失，但是小米卻有著能耐逆境的能力，所以在水稻難以種植的地區，小米也許就可以被種植在當地，並被當作主食。

## 捌、參考資料及其他

劉玉山、張永達(2009年4月21日)植物對鹽逆境(Salinity Stress)的反應·取自

<http://highscope.ch.ntu.edu.tw/wordpress/?p=1007>

水稻耐鹽性之介紹

László Szabados, Arnould Savouré(2009). Proline: a multifunctional amino acid *Trends in*

*Plant Science*, 15, 89-97. Retrieved

December 23,

2009, from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1360138509002982>

Mehmet Ozaslan Journal of Biological Sciences(ISSN 1727-3048) MA: Asian Network for Scientific Information

<http://scialert.net/jindex.php?issn=1727-3048>

楊茜雯、巴洛克、陳奕婷(2015)養我育我的部落勇士—探討小米 (becenge) 的生存之秘·

臺南：臺南市私立德光高級中學(附設國中)

<http://science.ntsec.edu.tw/Science-Content.aspx?cat=&a=0&fld=1000000&key=&isd=1&icop=10&p=1&sid=12514>

## 玖、附件

| Rice       | Locus          |  | Foxtail millet | Locus        |
|------------|----------------|--|----------------|--------------|
| amylaseR1  | LOC_Os01g25510 |  | amylaseS1      | LOC101785335 |
| amylaseR2  | LOC_Os01g51754 |  | amylaseS2      | LOC101783371 |
| amylaseR3  | LOC_Os02g52700 |  | amylaseS3      | LOC101782965 |
| amylaseR4  | LOC_Os02g52710 |  | amylaseS4      | LOC101776395 |
| amylaseR5  | LOC_Os04g33040 |  | amylaseS5      | LOC101768040 |
| amylaseR6  | LOC_Os06g49970 |  | amylaseS6      | LOC101767641 |
| amylaseR7  | LOC_Os08g36900 |  | amylaseS7      | LOC101767247 |
| amylaseR8  | LOC_Os08g36910 |  | amylaseS8      | LOC101761684 |
| amylaseR9  | LOC_Os09g28400 |  | amylaseS9      | LOC101761291 |
| amylaseR10 | LOC_Os09g28420 |  | amylaseS10     | LOC101760886 |
|            |                |  | amylaseS11     | LOC101760405 |

(表二)澱粉酶胺基酸序列對照表

## 【評語】 060002

小米具耐乾耐鹽的特性，而水稻具耐淹水的特性，當利用一些指標性生理測定如：抗氧化酵素、脯胺酸累積來解釋所觀察到的現象時，須特別地小心。本實驗所測定的項目很多，在進行口頭報告時也敘述的十分清楚。為希望加強小米與本土的連結性，並且釐清在眾多的數據中，所謂的“賣點”是在哪裡？並且可以有合理的解釋。